

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Efecto de la descontaminación digestiva selectiva sobre el
daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yeny Rojas Vega

Directores

José A. Lorente Balanza
Francisco Pérez Vizcaíno

Madrid, 2017

© Yeny Rojas Vega, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

FARMACOLOGÍA Y TERAPEUTICA HUMANA



**EFFECTO DE LA DESCONTAMINACIÓN DIGESTIVA
SELECTIVA SOBRE EL DAÑO PULMONAR INDUCIDO
POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA**

TESIS DOCTORAL DE

YENY ROJAS VEGA

DIRIGIDA POR

DR. JOSE A. LORENTE BALANZA

DR. FRANCISCO PÉREZ VIZCAÍNO

Madrid, 2015

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del FIS P109902624, PI0902644 y al soporte del CIBER de Enfermedades Respiratorias (Instituto de Salud Carlos III – CB06/06/0002).



ABREVIATURAS

ARDS	síndrome de distrés respiratorio agudo
BSA	albúmina sérica bovina
CK	creatinina quinasa
CRS	distensibilidad dinámica del sistema respiratorio
DDS	descontaminación digestiva selectiva
DMSO	dimetilsulfóxido
DPA	daño pulmonar agudo
EDTA	ácido etilen-diamino tetra-acético
ELISA	ensayo inmunoenzimático absorbente
FiO ₂	fracción inspirada de oxígeno
GOT	transaminasa glutámico- oxalacética
GPT	transaminasa glutámica pirúvica
IL	interleuquina
LBA	lavado broncoalveolar
LDH	lactato deshidrogenasa
LPA	lesión pulmonar aguda
LPS	lipopolisacárido bacteriano
MCP-1	proteína quimiotáctica de macrófagos-1
MIP-2	proteína inflamatoria de macrófagos-2
ml	mililitro
NF- κ B	factor nuclear kappa B
PAM	presión arterial media
PaO ₂	presión arterial de oxígeno
PaCO ₂	presión parcial arterial de dióxido de carbono
PIP	presión pico de la vía aérea
PEEP	presión positiva al final de la expiración
PBS	tampón fosfato salino
SD	sprague- Dawley
SDRA	síndrome de distres respiratorio agudo
SDS	dodecil sulfato sódico

SE	error estándar de la media
TNF- α	factor de necrosis tumoral
TLR	receptores tipo toll
UCI	unidad de cuidados intensivos
VEH	vehículo
VILI	lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica (ventilator-induced lung injury)
VM	ventilación mecánica
VT	volumen corriente (tidal)

INDICE

I. RESUMEN / SUMMARY.....	2
II.INTRODUCCIÓN.....	15
III, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	58
IV. Capítulo 1: Comparación de diferentes protocolos de Descontaminación digestiva selectiva.....	62
1. RESUMEN.....	64
2. INTRODUCCIÓN	65
3. HIPÓTESIS	66
4. OBJETIVOS	66
5. MATERIALES Y MÉTODOS	66
6. RESULTADOS	68
7. DISCUSIÓN	71
V. Capítulo 2: Efectos de la descontaminación digestiva selectiva sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica	78
1. RESUMEN	80
2. HIPOTESIS	82
3. OBJETIVOS	82
4. MATERIALES Y MÉTODOS	83
5. RESULTADOS	98
6. DISCUSIÓN	134
VI. Capítulo 3: Relación entre la presión pico de la vía aérea basal con los efectos de la descontaminación digestiva selectiva sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica	168
1. RESUMEN	170
2. OBJETIVOS	172
3. MATERIAL Y MÉTODOS	172
4. RESULTADOS	174
5. DISCUSIÓN	212
VII. CONCLUSIONES.....	226
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	230

I. RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

1. Introducción

La insuficiencia respiratoria aguda es un hallazgo frecuente en la unidad de cuidados intensivos y es responsable del uso de la ventilación mecánica (VM). El daño o injuria producida por la VM es una entidad ampliamente conocida en la literatura médica. Desde la década de los setenta, varios estudios han tratado de averiguar los determinantes de este daño, introduciéndose los conceptos de barotrauma y volutrauma. El trabajo pionero de Webb y Tierney publicado en 1974 mostró que las presiones altas en el ventilador mecánico podrían inducir daño pulmonar y que este efecto se prevenía por el uso de la PEEP [1]. En concordancia con estos hallazgos, Dreyfuss y cols publicaron varios artículos describiendo el papel del volumen corriente (Tidal Volume, V_T) y las presiones en la vía aérea en la fisiopatología de este daño. Estos estudios confirmaron el papel fundamental del volumen corriente en la génesis de este daño [2, 3]. Para enfatizar aún más el papel fundamental del volumen, el ARDS network mostró que el uso de V_T bajo produce una disminución de la mortalidad y un aumento del número de días sin uso de la ventilación mecánica cuando el paciente con distress recibía 6 ml/kg comparado con 12 ml/kg. Varios mecanismos pueden ser responsables para esta reducción de la mortalidad, siendo el papel de la inflamación tema de muchos estudios. De hecho, el uso de la ventilación mecánica produce un incremento de mediadores inflamatorios a nivel pulmonar. De hecho, en pulmones de rata ventiladas ex vivo, varias estrategias ventilatorias dan lugar a un aumento de la liberación de citoquinas en BAL con efectos pro y antiinflamatorios, siendo el volumen corriente elevado el principal factor determinante [4][5-7]. Nepomuk y cols demostraron en un modelo pulmonar de ratón que la inducción de VILI (daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica) estaba asociada a la liberación de varios mediadores inflamatorios hacia la circulación sistémica [8]. Finalmente, en un modelo de daño pulmonar, Chiumello demostró in vivo la liberación hacia la circulación sistémica de mediadores inflamatorios con volúmenes corrientes altos (16 ml/kg).

Por lo tanto, la liberación de mediadores proinflamatorios podría jugar un papel en la respuesta inflamatoria sistémica implicada en la fisiopatología de la disfunción orgánica múltiple. De hecho, muchos investigadores han demostrado cambios de PO_2 a nivel intestinal y de permeabilidad en respuesta a varios tipos de injuria, incluyendo procesos inflamatorios agudos. Otros autores también han demostrado que el uso de estrategias no protectoras de ventilación mecánica producen una translocación sistémica de endotoxina [9] o diseminación de E.coli [10] instilada.

Por lo tanto, nosotros hemos elegido el estudiar el papel de las bacterias intestinales en la respuesta pulmonar y sistémica a la ventilación mecánica.

En el presente estudio planteamos la hipótesis de que la microflora intestinal modula la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica inducida por la ventilación mecánica.

Para erradicar la flora bacteriana Gram-negativa intestinal de las ratas administramos por vía oral una solución de descontaminación digestiva selectiva (DDS) que hemos puesto a punto. La DDS es una estrategia preventiva utilizada en la práctica clínica para eliminar la flora intestinal gramnegativa potencialmente patógena con el fin de reducir la incidencia de la neumonía y de la mortalidad.

Dada la importancia de un correcto manejo de los parámetros ventilatorios para mantener a los pacientes con ARDS y ALI, se ha comenzado a estudiar el efecto de la ventilación en pulmones sanos. Para ello la utilización de modelos animales expuestos a estrategias ventilatorias convencionales o dañinas previamente tratadas y no tratadas con DDS es indispensable para conocer mejor los mecanismos que inducen VILI y el rol de la flora bacteriana intestinal en la respuesta pulmonar y sistémica a la ventilación mecánica

En esta tesis, las ratas sanas tratadas y no tratadas con DDS han sido expuestas a las siguientes estrategias ventilatorias:

- Ventilación mecánica convencional (V_T Bajo) durante 2.5 h caracterizada por volumen bajo ($V_T = 9$ ml/kg) y aplicación de PEEP (PEEP=5 cm H₂O), con el objetivo de simular una estrategia ventilatoria utilizada habitualmente en la unidad de cuidados intensivos.
- Ventilación mecánica perjudicial (V_T Alto) durante 2.5 h caracterizada por volumen corriente alto ($V_T = 25$ ml/kg) y ausencia de PEEP ya que nuestro objetivo es provocar alteraciones alveolares causadas por volutrauma, atelectrauma y/o biotrauma

Se estudiaron cuatro grupos de animales, según fueran tratados con DDS o con vehículo: V_T Bajo + vehículo, V_T Bajo + DDS, V_T Alto + vehículo y V_T Alto + DDS.

2. Objetivos

Esta tesis comprende tres capítulos, en los cuales se evalúan:

La puesta a punto de un protocolo eficaz de DDS en ratas para disminuir la colonización del tracto digestivo por bacterias Gram-negativas. En este estudio se reproducen los protocolos más utilizados en trabajos previos y se comparan con el protocolo nuevo que diseñamos (capítulo 1).

Los efectos del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica agresiva sobre la función cardiovascular, la mecánica respiratoria, la función pulmonar, la afectación de otros órganos, la respuesta inflamatoria y apoptótica en tejido pulmonar y la respuesta inflamatoria intestinal y sistémica (capítulo 2).

La relación entre la presión de la vía aérea y los efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la mecánica respiratoria, la función pulmonar, la hemodinámica, la afectación de

otros órganos, la respuesta inflamatoria, la apoptosis y la expresión de TLR-4 en tejido pulmonar y la respuesta inflamatoria intestinal y sistémica (capítulo 3).

3. Resultados

Capítulo 1

Se compararon tres regímenes antibióticos: Régimen A (n=8): tobramicina (0,5mg/ml) y polimixina E (1mg/ml) adicionados al agua de bebida durante 7 días, Régimen B (n=9): tobramicina (12mg/ml) y polimixina E (30mg/ml). Se administró 1 ml mediante una sonda orogástrica estéril cada 24 horas durante 7 días y Régimen C (n=9): tobramicina (6mg/ml) y polimixina E (15mg/ml). Se administró 1 ml mediante una sonda orogástrica estéril cada 12 horas durante 5 días.

Las muestras basales de heces de rata (antes de la administración de DDS) contenían $4,0 \pm 1,5$ log UFC/g de microorganismos Gram-negativos. Tras 24 horas de tratamiento con DDS, 1/8, 9/9, 8/9 ratas fueron descontaminadas (no mostraban crecimiento de Gram-negativos en las muestras fecales) con los protocolos A, B y C, respectivamente ($p < 0,001$).

Capítulo 2

Efectos de la ventilación mecánica

Las ratas que se sometieron a un V_T elevado mostraron hipotensión, disminución de la distensibilidad pulmonar e hipoxemia, así como un aumento de la concentración de proteínas e IgM en el LBA.

En el tejido pulmonar, aumentó la concentración tisular de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1 y de la expresión de sus genes correspondientes. La expresión génica de CXCR2 disminuyó en animales que recibieron V_T elevado. Asimismo, la concentración de TLR-4 disminuyó. También se observaron alteraciones histológicas consistentes con la presencia de daño pulmonar agudo (presencia de membranas hialinas) y de aumento de la apoptosis (TUNEL).

En el suero, la ventilación mecánica con V_T elevado aumentó la concentración de MIP-2, en comparación con V_T Bajo. En el tejido intestinal, la ventilación mecánica con V_T elevado, en comparación con V_T bajo, se asoció con una menor concentración de MIP-2 y una menor expresión del gen MIP-2.

Efecto del tratamiento con DDS

El tratamiento con DDS en los animales que recibieron ventilación mecánica con VT bajo no se asoció a ningún cambio de la presión arterial, distensibilidad pulmonar, intercambio gaseoso, concentración de IgM o proteínas en LBA.

En tejido pulmonar, se observó una tendencia (no significativa) a una mayor concentración de TNF- α , MIP-2 y MCP-1, en comparación con el grupo no tratado con DDS, y a una menor expresión génica (no significativa) de MIP-2 y MCP-1.

En el suero, el tratamiento con DDS se asoció con una disminución de la concentración de TNF- α , IL-6 en comparación con el grupo no tratado. En el tejido intestinal, los animales tratados con DDS mostraron una mayor concentración de IL-6, una menor concentración de MIP-2, y una menor expresión de los genes IL-6, MIP-2 y CXCR2.

Efectos del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

En los animales que recibieron ventilación mecánica con VT elevado, el tratamiento con DDS se asoció, en comparación con los animales que no recibieron DDS, con una atenuación en el aumento de la permeabilidad alveolocapilar y una atenuación de la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar (menor elevación de la concentración tisular de TNF- α , IL-6 y MCP-1).

En el suero, los efectos de la ventilación mecánica no se modificaron por el tratamiento con DDS. En el tejido intestinal, el tratamiento con DDS no modificó la respuesta a la ventilación mecánica con VT elevado.

Capítulo 3**Efectos de la ventilación mecánica**

Las ratas que recibieron VT alto con valor de PIP basal (≥ 27 cmH₂O) en comparación con aquellas que presentaban PIP basal (< 27 cmH₂O) mostraron hipotensión, disminución de la distensibilidad pulmonar, hipoxemia, signos de daño sistémico, así como aumento de la concentración de proteínas e IgM en el LBA, de apoptosis, de la concentración tisular de TNF- α , MCP-1, IL-1- β así como un aumento de la expresión de genes de IL-6 y MCP-1, y alteraciones histológicas consistentes con la presencia de daño pulmonar agudo (presencia de membranas hialinas).

La ventilación mecánica con VT elevado con valor de PIP basal baja (\leq PIP 27 cmH₂O) no altera los niveles de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 Y IL-1 β , en comparación con las de PIP basal elevada (\geq PIP 27 cmH₂O).

En el tejido intestinal, las ratas con valor de PIP basal (≥ 27 cmH₂O), en comparación con las de PIP basal (< 27 cmH₂O), se encontró una mayor concentración (aunque no alcanzó la significación estadística) de TNF- α , MIP-2 y MCP-1 y una mayor expresión de genes MIP-2 y CXCR2.

Efecto del tratamiento con DDS

El tratamiento con DDS en los animales que recibieron ventilación mecánica con V_T elevado con valor PIP basal $<27\text{cmH}_2\text{O}$ en comparación con el grupo no tratado no se asoció a ningún cambio de la presión arterial, distensibilidad pulmonar, intercambio gaseoso, concentración de IgM o proteínas en LBA. En el tejido pulmonar se observó una mayor concentración de IL-6, en comparación con el grupo no tratado con DDS, y una menor expresión génica (no significativa de MIP-2).

En el suero, el tratamiento con DDS se asoció con una disminución de la concentración de TNF- α en comparación con el grupo no tratado. En el tejido intestinal, los animales tratados con DDS mostraron una respuesta inflamatoria atenuada (menor concentración aunque estadísticamente no significativa de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1) y no hubo cambios en la expresión de genes.

El tratamiento con DDS en los animales que recibieron ventilación mecánica con V_T elevado con valor PIP basal $\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$ en comparación con el grupo no tratado se asoció con una atenuación de la elevación de la resistencia de la vía aérea (R_{aw} *Airway Resistance*) y atenuación del aumento de la permeabilidad alveolocapilar y de la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar (menor elevación de la concentración tisular de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1).

En el suero, el tratamiento de la DDS atenúa la respuesta inflamatoria (disminuye el TNF- α y la IL-6). En el tejido intestinal, el tratamiento con DDS mostró una menor concentración de IL-6, y una menor expresión de genes CXCR2 y MIP-2.

4. Conclusiones

Capítulo 1

La administración de DDS mediante una sonda orogástrica estéril cada 24 horas es eficaz para descontaminar el tracto digestivo en ratas en tan sólo 24 horas de tratamiento; (ii) no es necesaria la administración de la DDS de forma más frecuente (i.e; cada 12 horas); (iii) la administración oral ad libitum, tal como se ha utilizado en otros estudios, es ineficaz.

Capítulo 2

El tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria pulmonar asociada a la VM utilizando volúmenes tidales elevados. Nuestros resultados demuestran que la flora intestinal modula la respuesta pulmonar a un estímulo inflamatorio.

Capítulo 3

Los efectos nocivos de la ventilación mecánica con VT elevado se aprecian sólo en los animales que presentan un valor elevado de PIP al inicio del experimento. Sólo en este grupo con PIP elevada se demuestran los efectos beneficiosos del tratamiento con DDS.

SUMMARY

1. Introduction

Acute lung injury is often found in the intensive care unit and it is responsible for the initiation of mechanical ventilation. It is widely known in the medical literature that mechanical ventilation itself can induce lung injury. Since the early seventies, several studies have focused on the factors involved in this injury, introducing the concepts of barotrauma and volutrauma which point to increased airway pressure or increased lung volume, respectively as the cause of the injury. The pioneering work of Webb and Tierney published in 1974 showed that high pressure could induce lung injury and that this effect could be prevented by using positive end-expiratory pressure (PEEP). Consistent with these data, Dreyfuss et al. published several articles reporting the respective role of tidal volume and airway pressure in the pathophysiology of this injury. Lessons obtained from these studies confirm the prominent role of tidal volume in the origin of the injury. To further underline the major role of volume, the acute respiratory distress syndrome (ARDS) network showed the effect of volume limitation in acute lung injury, resulting in decreased mortality and increased number of days without ventilator use when the patient receive 6 ml/kg compared with 12 ml/kg.

Different mechanisms could be responsible for this improvement, but several studies have explored the role of inflammation. In fact, mechanical ventilation has been shown to increase lung levels of inflammatory cells and soluble mediators. In perfused and ventilated rat lungs *ex vivo*, several ventilator strategies increased the concentration of cytokines with both pro and anti-inflammatory effects in bronchoalveolar lavage (BAL) being high tidal volume the main contributing factor. Nepomuk et al. Showed in an isolated perfused mouse model of ventilator-induced lung injury (VILI) that high tidal volume was associated with the release of several proinflammatory mediators into the systemic circulation. Finally, in a model of lung injury induced by high tidal volume (16 ml/kg) *in vivo*, Chiumello showed a systemic release of inflammatory mediators.

The release of proinflammatory mediators could therefore participate in the systemic inflammatory response that has been implicated in the pathophysiology of multiple organ dysfunction. Indeed, many investigators have demonstrated changes in gut PO₂ and permeability in response to various types of injuries, including acute inflammatory processes. Other authors have also shown with ventilatory nonprotective strategies lung to systemic translocation of endotoxin or dissemination of instilled *E. coli*.

In this study we hypothesize that mechanical ventilation-induced lung and systemic inflammatory response is modulated by gut microbiota.

Given the importance of ventilatory management for acute respiratory syndrome (ARDS or ALI) [11, 12], investigators have started to explore the effects of ventilation in healthy lungs. Animal models exposed to conventional and injurious ventilator strategies are being used to understand the mechanism of lung injury induced by mechanical ventilation

In this thesis, healthy rats treated and untreated with SDD have been exposed to the following ventilator strategies:

- Conventional low-stretch ventilation (low V_T) during 2.5 h, with moderated tidal volume ($V_T = 9 \text{ ml/kg}$) and application of positive end-expiratory pressure (PEEP=5 cmH_2O), to emulate a ventilator strategy widely used in critical care units.
- Injurious high-stretch ventilation (high V_T) during 2.5 h, with high tidal volumes ($V_T = 25 \text{ ml/kg}$) and without PEEP application since our aim was to provoke alveolar alteration caused by volutrauma, atelectrauma, and/or biotrauma.

2. Objectives

This thesis is composed of three chapters with the following specific aims:

- To develop an efficient SDD regimen to reduce gram negative bacteria in faecal samples. We employed the protocols used in previous studies and compared them to a novel protocol designed by us (Chapter 1).
- To analyse the impact of SDD on the changes induced by mechanical ventilation on cardiovascular function, respiratory mechanics, pulmonary function, the effect on other organs, inflammatory and apoptotic response in lung tissue and intestinal and systemic inflammatory response (Chapter 2).
- To analyse the relationship between airway pressure and the effects of the SDD on the changes induced by mechanical ventilation with high V_T on respiratory mechanics, pulmonary function, hemodynamics, the involvement of other organs, inflammatory response, apoptotic expression of TLR-4 pulmonary, and intestinal and systemic inflammatory response (Chapter 3).

3. Results

Chapter 1

Baseline *Three different antibiotic regimens were compared: A (n=8): tobramycin (0,5mg/ml) and polimyxin E (1mg/ml) added to drinking water for 7 days, B (n=9): tobramycin (12mg/ml) and polimyxin E (30mg/ml) in 1 ml by a gastric gavage every 24 h for 7 days and C (n=9): tobramycin (6mg/ml) y polimyxin E (15mg/ml) in 1 ml using a gastric gavage every 24 for 5 days.*

Baseline faecal samples (before administration SDD) contained $4.0 \pm 1.5 \text{ log CFU/g}$ of Gram-negative microorganisms. After 24 hours of SDD treatment, 1/8, 9/9, 8/9 ratas were decontaminated with protocols A, B and C respectively ($p < 0.001$).

Chapter 2

Mechanical ventilation effects

Rats receiving high V_T showed hypotension, reduction of the pulmonary distensibility and hypoxemia, as well as an increased protein and IgM concentrations in BAL.

In lung tissue, the concentrations of TNF- α , IL-6, MIP-2 and MCP-1 and the expression of their corresponding genes were increased. Gene expression of CXCR2 and TLR4 decreased in animals receiving high V_T . Histologic alterations were observed in the high V_T group with the presence of acute lung injury (presence of hyaline membranes) and enhanced apoptosis (TUNEL).

In serum, high V_T mechanical ventilation increased the concentration of MIP-2 compared with low V_T . In gut tissue, high V_T mechanical ventilation, relative to low V_T , was associated with lower MIP-2 concentration and downregulation of MIP-2 gene expression.

Effects of DDS treatment

In animals under low V_T mechanical ventilation SDD treatment was not associated with changes in arterial pressure, pulmonary distensibility, gas exchange, IgM or protein concentrations in BAL. In pulmonary tissue, a non-significant increase in the concentration of TNF- α , MIP-2 and MCP-1 was observed, compared to non-treated group with DSS. In addition, lower gene expression of MIP-2 and MCP-1 was also observed.

In serum, SDD treatment was associated with a decrease in the concentration of TNF- α and IL-6, relative to untreated group. In intestinal tissue, animals treated with DDS showed a higher concentration of IL-6, lower concentration of MIP-2 and lower expression of the IL-6, MIP-2 and CXCR2 genes.

Effects of DDS treatment on induced changes by mechanical ventilation

In animals under high V_T mechanical ventilation, SDD treatment was associated with attenuation of the increased alveolar-capillary permeability and attenuation of the inflammatory response in lung tissue (lower increase of the concentration of TNF- α , IL-6 and MCP-1).

In serum, the effects of mechanical ventilation were not modified by SDD. In intestinal tissue, SDD treatment did not modify the response to high V_T .

Chapter 3

Mechanical ventilation effects

Relative to rats showing basal peak inspiratory pressure (PIP <27 cmH₂O), rats receiving high V_T with high basal PIP (≥27 cmH₂O) showed hypotension, decreased of the pulmonary distensibility, hypoxia, signs of systemic damage and an increase of the concentration of proteins and IgM in BAL. In addition, these rats showed enhanced apoptosis, an augmented tissue concentration of TNF-α, MCP-1, IL-1β, an increased expression of IL-6 and MCP-1 genes as well as histologic alterations consistent with the presence of acute lung injury (presence of hyaline membranes).

Mechanical ventilation with high V_T and low basal PIP value (≤PIP 27 cmH₂O) did not alter the levels of TNF-α, IL-6, MIP-2 and IL-1β levels, compared with high basal PIP (≥PIP 27 cm H₂O).

In intestinal tissue, rats with high basal PIP values (≥27 cmH₂O), relative to rats with low basal PIP (<27 cm H₂O), we found a non-significant higher concentration of TNF-α, MIP-2 and MCP-1 as well as an increased expression of MIP-2 and CXCR2 genes.

Effects of DDS treatment

Treatment with DDS in animals receiving mechanical ventilation with high V_T and basal PIP values < 27cm H₂O was not associated with any change in blood pressure, lung compliance, gas exchange and concentrations of IgM or proteins in LBA compared to the non-treated group. In the lung tissue we found a higher concentration of IL-6, compared to the non DSS-treated, and a lower (non-significant) MIP-2 gene expression. In the serum, treatment with DDS was associated with a decrease in the concentration of TNF-α compared with the untreated group. In the intestinal tissue, DDS-treated animals showed an attenuated inflammatory response (a non significant trend for lower concentration of IL-6, TNF-α and MCP-1, MIP-2) and there were no changes in the gene expression.

Treatment with SDD in animals receiving mechanical ventilation with high V_T and basal PIP ≥27cm H₂O was associated with an attenuation of the elevation of the airway resistance (R_{AW}) and attenuation of the increased alveolar-capillary permeability and inflammatory response in the lung tissue (lower elevation of tissue concentration of TNF-α IL-6, MIP-2 and MCP-1) compared to the non-treated group. In the serum, the SDD treatment attenuates the inflammatory response (lowers TNF-α and IL-6). In the intestinal tissue, treatment with SDD led to lower concentrations of IL-6, and a lower expression of CXCR2 and MIP-2 genes.

4. Conclusions

Chapter 1

(i) SDD in a single daily administration by oral gavage is effective to eradicate aerobic Gram-negative bacteria. (ii) There is no advantage of twice vs single daily

administration of SDD. (iii) Oral administration (ad libitum) as used in other studies, is inefficient.

Chapter 2

SDD treatment attenuates systemic and pulmonary inflammatory response associated with mechanical ventilation using high tidal volume. Our results show that intestinal microbiota modulates the lung inflammatory response.

Chapter 3

The deleterious effects of mechanical ventilations with high VT are only appreciated in those animals with a high PIP value at the beginning of the experiment. The beneficial effects of SDD can be only observed in this group with high PIP.

II. INTRODUCCIÓN

1. Concepto de síndrome de distrés respiratorio agudo

El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) es una inflamación pulmonar aguda en el contexto de un factor de riesgo pulmonar o no pulmonar. El proceso inflamatorio se acompaña de hiperpermeabilidad alveolocapilar y formación de edema pulmonar. En la práctica clínica esta condición se presenta como insuficiencia respiratoria aguda en el contexto de otra condición se presenta como insuficiencia respiratoria aguda en el contexto de otra condición (pulmonar, como neumonía; o extrapulmonar, como sepsis u otro origen, o trauma múltiple), que requiere tratamiento de soporte ventilatorio en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Numerosos estudios han abordado el problema de la patogénesis y tratamiento de esta condición. Se han desarrollado modelos animales con el objetivo de analizar los mecanismos de daño epitelial y endotelial. Estos modelos deben reproducir los cambios característicos de SDRA, principalmente los referentes al desarrollo de inflamación tras un insulto. En investigación básica la denominación más aceptada es la del daño pulmonar agudo o acute lung injury (DPA/ALI). En la presente memoria, nos referiremos en general la forma indistinta a SDRA y a DPA.

El SDRA fue descrito por primera vez por Ashbaugh y cols en el año de 1967 (Ashbaugh 1967). La conferencia de consenso americano-europea (AECC) propuso en 1994 los siguientes criterios de diagnósticos: insuficiencia respiratoria de comienzo agudo, radiografía de tórax con infiltrados bilaterales, presión de enclavamiento de la arteria pulmonar menor de 18 mmHg, cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ menor que 200 mmHg y una causa predisponente conocida. Las causa predisponente para SDRA puede ser pulmonar o directa (neumonía, aspiración o trauma pulmonar) o bien extrapulmonar o indirecta (pancreatitis, hemorragia o shock).

Tras la publicación de los criterios de AECC pronto se hicieron evidentes las limitaciones de esta definición [14, 15]. Por ejemplo, no se contempla el efecto de la PEEP sobre el criterio de oxigenación. Por otro lado el edema pulmonar cardiogénico era un criterio excluyente para el diagnóstico de SDRA. Sin embargo, hoy se reconoce que el SDRA (edema pulmonar con hiperpermeabilidad) se asocia a edema pulmonar que, aun originándose por un mecanismo de hiperpermeabilidad, puede tener un componente hidrostático. Es decir, que el SDRA y el edema pulmonar cardiogénico puede coexistir. [16,17]

Más recientemente, con el objeto de resolver las limitaciones de la definición de AECC, se convocó en 2011 una nueva conferencia de consenso en Berlín que propuso una nueva definición (Definición de Berlín, BD) [14]

Se propusieron variables que tenían que cumplir con los siguientes tres criterios: fiabilidad, confiabilidad y validez. Las variables diagnósticas propuestas fueron: tiempo de inicio desde la identificación del factor de riesgo, grado de hipoxemia (según PaO_2 y nivel de PEEP), origen del edema, y anomalías radiológicas (Tabla 1). La BD clasifica a los pacientes de acuerdo a su gravedad [18]. En esta nueva definición de

SDRA se estratifica la gravedad en tres niveles: leve, moderado y grave de acuerdo a la hipoxemia presente. De tal modo que una leve ($PaO_2/FiO_2 = 201-300$ mmHg), moderado ($PaO_2/FiO_2 \leq 200$ mmHg), y grave ($PaO_2/FiO_2 \leq 100$ mmHg). La PEEP afecta notablemente la PaO_2/FiO_2 , por tanto se incluyó en la definición de SDRA y un nivel mínimo de PEEP (5 cmH₂O) en cualquier nivel de gravedad.

Los autores [18] evaluaron y validaron la nueva definición de Berlín en una cohorte retrospectiva de 4.188 pacientes con SDRA, la cual fue comparada con la antigua definición de SDRA. Usando la nueva definición de Berlín, los diferentes grados de gravedad (leve, moderado, grave) se asociaron con un incremento de la mortalidad (27%, 32% y 45% respectivamente, $p < 0.01$) y un incremento en la duración de la ventilación mecánica en los supervivientes (5, 7 y 9 días, respectivamente; $p < 0.001$) [18]

Los autores eliminan el concepto de ALI (*Acute Lung Injury*) o Daño Pulmonar Agudo, que se denomina ahora SDRA leve.

Tabla 1. Nueva definición de Berlín de síndrome de distrés respiratorio agudo

Leve	Moderado	Grave
Tiempo de Inicio deterioro de	Inicio dentro de 1 semana de conocida la injuria clínica o nuevo los síntomas respiratorios	
Imagen torácica pulmonar lobar ^a	Opacidades bilaterales- no explicable por derrame, atelectasia o pulmonar, o nódulos.	
Origen del edema	Falla respiratoria no explicable completamente por una insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos. Necesita evaluación objetiva (ejm. Ecocardiograma) para excluir edema hidrostático si no hay factor de riesgo presente.	
Hipoxemia ≤ 100 mmHg, con Cociente PaO_2/FiO_2 ≥ 5 cmH ₂ O	200-300 mmHg, con PEEP/CPAP ≥ 5 cmH ₂ O	$\leq 200 \rightarrow 100$ mmHg, con PEEP ≥ 5 cmH ₂ O

^aRadiografía de tórax o tomografía axial computarizada.

CPAP, *continuous positive airway pressure*; **FiO₂**, fracción inspirada de oxígeno; **PaO₂**, presión parcial arterial de oxígeno; **PEEP**, *positive end-expiratory pressure*.

2. Etiología y factores de riesgo

El DPA/SDRA puede desarrollarse debido a diferentes causas, que pueden ser (i) enfermedades pulmonares (daño pulmonar directo), como neumonía la contusión pulmonar o la aspiración del contenido gástrico; (ii) enfermedades extrapulmonares (daño pulmonar indirecto), como la sepsis, el trauma grave no pulmonar, o el shock (tabla 1) [19]. En los estudios epidemiológicos recientes, el DPA directo es más frecuente que el indirecto, correspondiendo a un 55-75% de los casos (tabla 2).

La importancia en la diferenciación entre el origen pulmonar y extrapulmonar del DPA se debe a que, como se ha señalado recientemente, existen diferencias en el patrón radiológico, en la mecánica pulmonar o en la respuesta al tratamiento.

Gattinoni y cols [20] estudiaron a 12 pacientes con SDRA de origen pulmonar (11 pacientes con neumonía y uno con alveolitis hemorrágica) y a 9 pacientes con SDRA de origen extrapulmonar (3 pacientes politraumatizados, 3 pacientes con peritonitis, 2 pacientes con infarto intestinal y uno con shock hemorrágico). A todos se les aplicaron diferentes niveles de PEEP y se analizaron los cambios en la mecánica respiratoria encontraron que los cambios son consistentes con una prevalencia de consolidación en los casos de SDRA de origen pulmonar y prevalencia de edema y colapso alveolar en el SDRA de origen extrapulmonar.

Goodman y cols [21] encuentra que el patrón radiológico del SDRA de origen extrapulmonar es “en vidrio deslustrado”, uniforme y simétrico, mientras que el SDRA del origen pulmonar la imagen en vidrio deslustrado no es prevalente y los infiltrados son claramente asimétricos.

Lim y cols [22] analizaron la respuesta a la posición prona de un grupo de 31 pacientes con SDRA, y encontraron que en la fase inicial del síndrome los casos de origen pulmonar y los de extrapulmonar responden de un modo diferente a la posición en prono en cuanto al tiempo en el que se producen los cambios en la oxigenación, los cambios en la mecánica respiratoria e incluso en las modificaciones en las imágenes radiológicas. Los autores concluyen ante estos hallazgos que hay dos categorías de SDRA y que incluso se trata de dos síndromes distintos que pueden requerir diferentes pautas de tratamiento con ventilación mecánica.

El riesgo de SDRA aumenta si en combinación con algún factor de riesgo, el paciente presenta algún otro factor predisponente, como 1) la edad avanzada, 2) el sexo femenino, 3) el abuso crónico de alcohol, 4) tabaquismo, 5) La enfermedad pulmonar crónica, 6) la severidad de la enfermedad subyacente y 7) la combinación de factores de riesgo.

Estos datos parecen proponer de un modo firme las posibles diferencias entre los pacientes que cumplen los criterios de diagnóstico de la conferencia consenso y cuyo origen es pulmonar y aquellos con los mismos criterios pero de origen extrapulmonar.

Nosotros en nuestro trabajo de investigación nos centramos en los efectos extrapulmonares (mediante el uso de la DDS en ratas ventiladas).

3. Impacto social

La relevancia social del problema de DPA esta bien documentada. Primero, la elevada mortalidad del DPA, afectando con frecuencia pacientes jóvenes (víctimas de trauma, quemaduras o neumonía). Segundo, el tiempo prolongado de recuperación que requieren los supervivientes antes de incorporarse de nuevo a la vida laboral y social activa sufriendo tras el alta de UCI morbilidad pulmonar y extrapulmonar. Tercero, la prevalencia creciente de esta enfermedad, al aumentar la frecuencia de los factores de riesgo (e. gr. Trasplante pulmonar, epidemias de neumonía por virus de la influenza, edad más avanzada de la población, etc).

Desde su primera descripción en 1967 el SDRA ha recibido más atención que ninguna otra entidad aislada dentro de los cuidados intensivos. Aproximadamente un 7-10% de los pacientes ingresados en UCI sufren DPA/SDRA [19, 23, 24], y el 5-8% de los pacientes que reciben ventilación mecánica tienen este diagnóstico. Unos estudios recientes han estimado la incidencia entre 5 y 80 casos por 100,000 habitantes por año [23, 25-28]. Siendo la mortalidad del DPA/SDRA entre un 35%-65%. ((null) (null)).

Se trata, pues, de un síndrome con una elevada incidencia y una alta mortalidad. Sin embargo, a pesar de avances en la medicina, en el conocimiento de la patogénesis de otras enfermedades, y en la implementación de nuevos y eficaces tratamientos para otras condiciones, la mortalidad del DPA/SDRA no ha variado en las tres últimas décadas [23, 29-34]. En una revisión sistemática rigurosa publicada en 2009 se determinó la mortalidad del SDRA se ha mantenido estable (44% en estudios observacionales y 36% en estudios aleatorizados, desde que la definición de la AECC fue publicada [35]. Por otro lado ningún tratamiento (a excepción del uso de volumen tidal bajo en la ventilación mecánica de estos pacientes y quizá la posición prona) se ha demostrado eficaz [36-39]

4. Mecanismos de daño epitelial alveolar: apoptosis

Los mecanismos propuestos en el DPA han de ser explicativos de varios procesos característicos del DPA, como son, entre otros, el desarrollo de una respuesta inflamatoria pulmonar tras un insulto, los cambios en la permeabilidad alveolocapilar y consiguiente formación de edema, la muerte celular en el epitelio alveolar y la lesión endotelial (Figura 3).

La muerte de células epiteliales alveolares podría contribuir a la disrupción de la barrera alveolar en SDRA leve debido al desprendimiento de células epiteliales y

consecuentemente la inundación de los espacios aéreos con fluido edematoso rico en proteínas [40] (Fig. 1).

La muerte celular puede ser primariamente por lisis de la membrana celular (necrosis) y salida posteriormente del contenido citoplasmático y nuclear por un proceso controlado de contracción celular con condensación de la cromatina y degradación del DNA (Apoptosis).

Ambos tipos de muerte celular han sido encontrados en la pared alveolar de pulmones de pacientes fallecidos con SDRA y en modelos animales de ALI inducido por hiperoxia, LPS, bleomicina, o punción y ligadura cecal, isquemia-reperfusión o ventilación [41, 42]. La muerte por apoptosis se asocia con la expresión en la superficie celular de receptores de muerte que permite el aclaramiento de células con escaso desarrollo de inflamación [40]. La apoptosis masiva y el desprendimiento de células del epitelio alveolar, podría exponer la membrana basal a productos inflamatorios como oxidantes, proteinasas y otros factores inflamatorios. Además, la destrucción del epitelio alveolar conduce a la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, lo cual puede producir fibrosis pulmonar. Por el contrario la apoptosis puede ser beneficiosa para la reparación pulmonar por medio de la resolución de la hiperplasia de los neumocitos tipo II o la limpieza de células inflamatorias [40]. A pesar de que la apoptosis ocurre en las células epiteliales alveolares en el DPA, su papel en la alteración de la función epitelial alveolar afectando a la permeabilidad a proteínas y el aclaramiento de fluido alveolar no han sido completamente aclaradas.

Las vías de señalización de la apoptosis son importantes en la patogénesis del SDRA, y la relevancia de la apoptosis varía según el tipo celular. El reclutamiento de neutrófilos activados hacia el pulmón es necesaria para erradicar la mayoría de los patógenos, pero el retraso en el aclaramiento de estos neutrófilos en los pulmones podría perpetuar el SDRA. Sorprendentemente el aumento en la concentración del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos en LBA (que retrasa la apoptosis de neutrófilos alveolares), se ha asociado con mejoría de la supervivencia en pacientes adultos con SDRA. Sin embargo, la inflamación continuada en el pulmón se ha asociado con una peor evolución y la apoptosis de neutrófilos es esencial para la resolución de la inflamación alveolar.

La apoptosis puede ser iniciada por la activación de la familia de receptores de muerte o directamente por daño mitocondrial. En el pulmón la activación de los complejos receptor/ligando de muerte, como Fas/FasL, TNF- α /TNFR, TGF- β 1/receptor TGFR- β y LPS/TLR4, lleva a la activación de una familia de caspasas. Inicialmente, la caspasa 8 activa a las caspasas efectoras (caspasa 3 y caspasa 7) resultando en la escisión del DNA nuclear y apoptosis. La activación de caspasa 8 es insuficiente para inducir muerte celular y requiere amplificación de la señal apoptótica por la mitocondria. Esta amplificación mitocondrial requiere activación de la familia de proteínas Bcl-2 (Bid, Bax o Bak), lo cual lleva a la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria y liberación de citocromo c, lo cual aumenta la activación de las caspasas efectoras. Esta vía apoptótica dependiente de la mitocondria es importante en modelos animales

de daño pulmonar inducido por hiperoxia/hipoxia, bleomicina, isquemia-reperfusión, ventilación mecánica y estrés nitro oxidativo.

La familia bcl-2 y la señalización mediada por Fas son importantes en el desarrollo de la apoptosis de las células alveolares epiteliales en modelos animales de SDRA y también en adultos con SDRA. El aumento en la concentración del ligando soluble de Fas en el LBA de pacientes adultos con SDRA se ha asociado con un aumento en la mortalidad, y el lavado broncoalveolar en pacientes adultos con SDRA produce apoptosis en cultivos de células humanas del epitelio pulmonar distal. Estos estudios han generado interés en tratamientos que modulen las vías de apoptosis.

La señalización apoptótica es modificada por una correulación de las vías de Fas y TLR-4 a través de dominio de muerte asociado a Fas así como la activación de las vías de Fas y Bcl-2 por señales inflamatorias. Las proteínas del surfactante regulan la apoptosis de las células epiteliales alveolares y los fibroblastos pulmonares así como el aclaramiento de células apoptóticas por los macrófagos.

En resumen, Fas/FasL juegan un papel esencial en la patogénesis del DPA mediante la inducción de apoptosis y activación de vías inflamatorias en una fase temprana pero también tiene un papel importante en la reparación pulmonar y fibrosis.

El sistema renina angiotensina también modula la apoptosis en los pulmones. La angiotensina II ha demostrado ser importante para LPS, Fas, y modelos de daño pulmonar con depleción del surfactante. El bloqueo del sistema renina angiotensina tiene efectos beneficiosos en modelos de SDRA.

El estrés oxidativo es otro modulador de la apoptosis en los pulmones, en parte por la modificación de la estructura y función del ligando de Fas. El estrés oxidativo es debido a los oxidantes producidos en el microambiente alveolar por los neutrófilos y otras células por las altas concentraciones de oxígeno inhalado. La lesión oxidativa pulmonar se ha estudiado ampliamente, y podrían existir posibles intervenciones terapéuticas en este campo.

El papel del NO generado por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la apoptosis de las células epiteliales alveolares no está claro. Algunos estudios sugiere que NO derivado de iNOS no es nocivo y podría incluso inhibir la apoptosis en células epiteliales alveolares en modelos de DPA inducidos por sepsis [43].

Las terapias potenciales anti apoptóticas podrían estar dirigidas a los complejos receptor de muerte/ligando tales como el sistema Fas ligando/Fas, caspasas o la familia de proteínas bcl-2. Debemos tener en cuenta que la prevención de la apoptosis de las células epiteliales alveolares en una fase temprana de DPA puede ser beneficiosa para reducir la progresión de esta enfermedad y evitar la fibrosis pulmonar, pero su inhibición en la fase proliferativa cuando hay hiperplasia epitelial podría entorpecer la reparación pulmonar. Además, el estado de daño pulmonar y la duración de los tratamientos dirigidos a la inhibición de la apoptosis pueden ser factores críticos en el diseño de tratamientos anti apoptosis en ALI.

5. Lesión del epitelio alveolar e hiperpermeabilidad alveolocapilar

Bachofen y Weibel, encontraron en los pacientes con SDRA alteraciones en las células endoteliales y, en mayor medida, en las células epiteliales [44]. El epitelio alveolar regula el contenido de agua y de solutos en el espacio alveolar, lo cual es importante para el adecuado intercambio de gases así como la defensa del huésped contra los patógenos virales y bacterianos. La lesión del epitelio alveolar da lugar a un aumento de la permeabilidad para las proteínas y a un deterioro del aclaramiento de las proteínas del fluido alveolar. Estas alteraciones conllevan a que los alveolos se inundan con proteínas de alto peso molecular, con el consiguiente empeoramiento del intercambio gaseoso [45].

El epitelio del alveolo es una barrera muy fina que restringe el paso de las proteínas y agua desde el intersticio al espacio alveolar debido a la presencia de proteínas de unión localizadas entre las células epiteliales alveolares adyacentes y que son responsables de que la barrera epitelial sea mucho menos permeable que la barrera endotelial [45]. Las proteínas de unión (*tight junction*) se encuentran localizadas en el extremo luminal del espacio intercelular y son las principales estructuras que limitan la difusión pasiva de las proteínas, lípidos y solutos entre las células epiteliales [46]. Las proteínas de unión también mantienen la polaridad epitelial y el transporte vectorial transcelular y paracelular que cruza el epitelio. Por lo tanto, la disfunción de las *tight junctions* no sólo da lugar un incremento de permeabilidad de proteínas sino también empeora la capacidad del epitelio alveolar para aclarar el fluido alveolar perpetuando la formación del edema rico en proteínas. Además la disfunción de las *tight junctions* facilita la translocación de endotoxinas y microbios del medio externo al compartimento sistémico, contribuyendo al desarrollo del daño multiorgánico [46].

Los componentes extracelulares de las *tight junctions* están formados por la familia de proteínas de zonula accludens (ZO). Estas proteínas interactúan con la membrana a través de muchas proteínas scaffolding (occludinas, claudinas, y moléculas de adhesión de unión) y estas últimas se unen a la actina del citoesqueleto. La actina y la miosina son dos componentes principales de la unión al citoesqueleto que interactúan regulando la tensión y contracción celular. Estas también tienen influencia sobre la función epitelial.

La desorganización y la disrupción de la interacción de las *tight junctions* y las fibras de actina incrementan la permeabilidad paracelular. El remodelamiento de la actina es regulado por las proteínas de la familia Rho y GTPasas pequeñas (RhoA y Rac1/2/3), quienes tienen efectos opuestos sobre la permeabilidad epitelial. Mientras la activación de Rac 1/2/3 preserva la integridad de la barrera epitelial y la permeabilidad, la activación de RhoA da lugar a la organización de las fibras de estrés de la actina, formación de grandes centros de adherencia y la interacción de la actina y las fibras de miosina a través de la fosforilación de la cadena ligera de miosina y dan lugar a la contracción celular y a un incremento de la permeabilidad paracelular. Se necesita un balance apropiado entre la RhoA y Rac1 para mantener la función epitelial normal. En

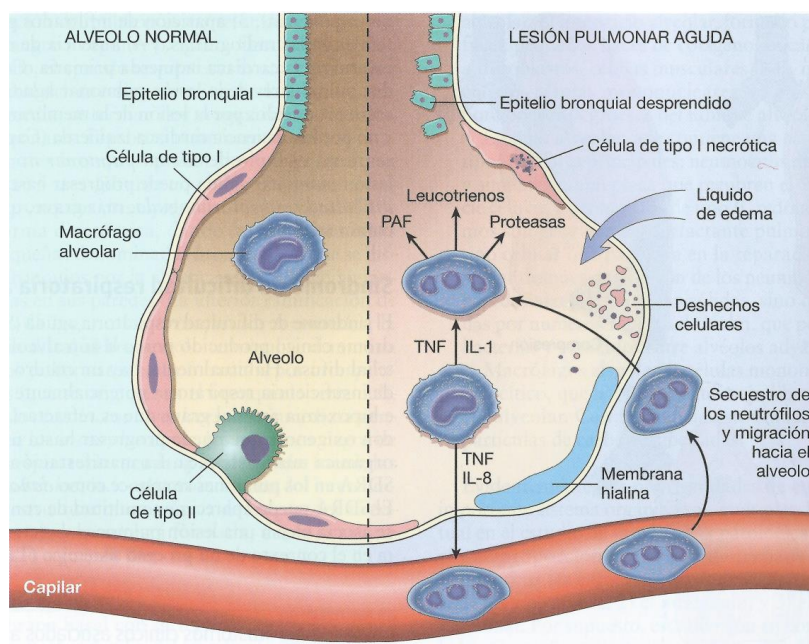
Todavía no se conocen las señales más inmediatas que producen la activación incontrolada de la respuesta inflamatoria aguda. Sin embargo el factor nuclear κ B (NF- κ B), un factor de transcripción cuya activación está estrechamente regulada en condiciones normales, se ha convertido en un posible candidato que desvía el equilibrio a favor del estado proinflamatorio.

Tan pronto como a los 30 minutos después de una agresión aguda se puede detectar un aumento de la síntesis de la interleucina 8 (IL-8), un potente agente quimiotáctico y activador de los neutrófilos, por macrófagos alveolares. La liberación de este compuesto y de otros similares, como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), producen activación endotelial, secuestro y activación de neutrófilos en el compartimento microvascular pulmonar. Se piensa que los neutrófilos tienen una función importante en la patogenia del SDRA.

El estudio histológico de los pulmones en las primeras fases del proceso muestra un aumento del número de neutrófilos dentro del espacio vascular, el intersticio y los alveolos. Los neutrófilos activados liberan productos diversos (oxidantes, proteasas, factor activador plaquetario y leucotrienos) que producen lesión del epitelio alveolar y mantienen la cascada inflamatoria [52].

El daño del endotelio y del epitelio perpetúa la hiperpermeabilidad vascular y la pérdida del surfactante, facilitando la formación de atelectasias. Los cambios proinflamatorios están en equilibrio con efectos anti-inflamatorios de anti-proteasas, antioxidantes y citocinas anti-inflamatorias de origen endógeno (e.g; IL-10) que son activadas por las citocinas proinflamatorias.

Figura 2.



El alveolo normal (izquierda) comparado con el alveolo lesionado en la fase temprana de la lesión pulmonar aguda en el síndrome de dificultad respiratoria aguda. Bajo la influencia de citocinas proinflamatorias, como la IL-8, IL-1 y TNF (liberadas por los macrófagos), los neutrófilos inicialmente quedan secuestrados en la microvasculatura pulmonar, seguido por marginación y salida hacia el espacio alveolar, donde son activados. Los neutrófilos activados liberan diversos factores como leucotrienos, oxidantes, proteasas, y factor activador de plaquetas (PAF), que contribuyen a la lesión tisular local, la acumulación de líquido de edema en los espacios aéreos, la inactivación del surfactante y la formación de membranas hialinas. Posteriormente, la liberación de citocinas fibrógenas derivadas de los macrófagos, como el factor de crecimiento y transformación β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), estimula el crecimiento de los fibroblastos y el depósito de colágeno asociados a la fase de curación de la lesión. (Modificada de WareLB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 342:1334, 2000).

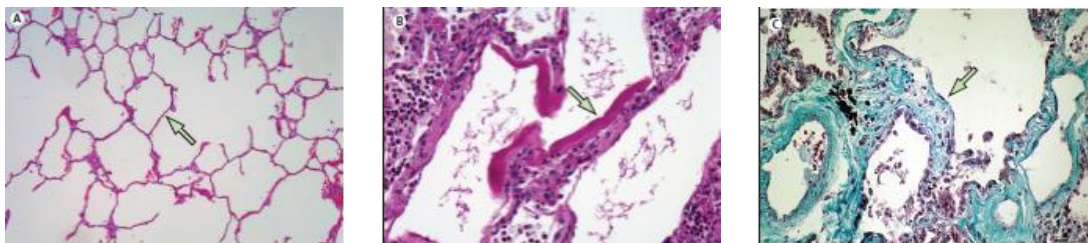
7. Cambios histológicos

Los cambios histológicos asociados al DPA/SDRA reflejan el desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda. Se observa congestión capilar, necrosis de las células epiteliales alveolares, edema y hemorragia intersticiales e intraalveolares, y (particularmente en la sepsis) acúmulo de neutrófilos en los capilares.

El hallazgo más característico en la presencia de membranas hialinas recubriendo los conductos alveolares distendidos (Fig.3). Estas membranas están formadas por líquido de edema rico en fibrina mezclado con restos de células epiteliales necróticas. En la fase organizativa hay una marcada proliferación de neumocitos tipo II en un intento de regenerar el revestimiento alveolar. La resolución es poco habitual. Con frecuencia se produce organización de los exudados de fibrina, con la consiguiente

fibrosis intraalveolar. Existe un marcado engrosamiento de los tabiques alveolares, producido por la proliferación de las células intersticiales y el depósito de colágeno.

Figura 3. Ejemplos de hallazgos histológicos



Panel izquierdo: alveolos de apariencia normal, con septos alveolocapilares delgados, que separan la sangre del espacio alveolar e incluyen las células endoteliales, membrana basal y células epiteliales. Panel central: pulmón con SDRA (la membrana basal del alveolo está recubierta por el material resultante de la destrucción de los neumocitos tipo I y que constituyen las membranas hialinas. Panel derecho: fibrosis de la membrana de los capilares y de los alveolos, en verde [53].

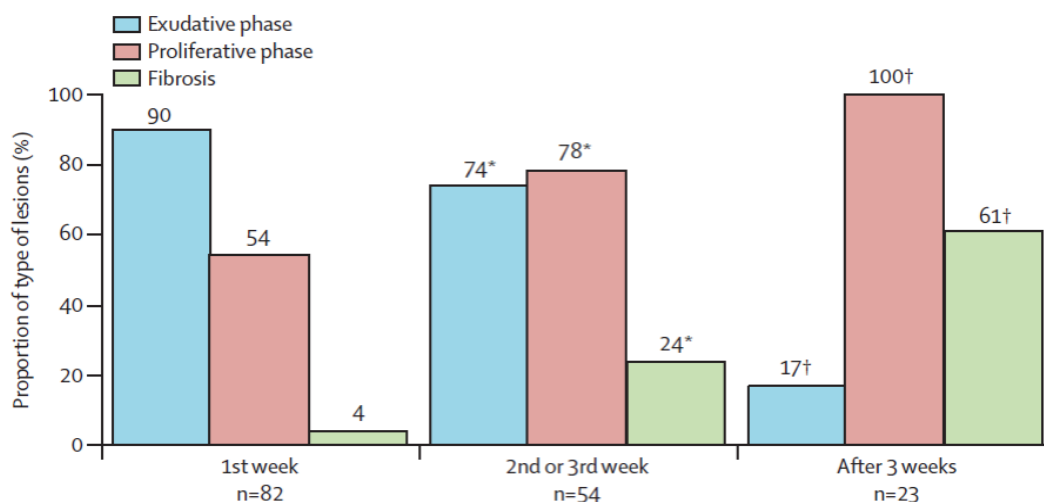
Los cambios morfológicos característicos del SDRA se denominan daño alveolar difuso (DAD), tal como fue descrito por Katzenstein y cols [54].

Generalmente estos cambios evolucionan en el tiempo en fases bien definidas (exudativa, proliferativa y fibrosis).

La fase exudativa se observa en la primera semana y se caracteriza por la presencia inicial de edema en el intersticio, seguido de la destrucción de los neumocitos tipo I que tapizan los alveolos, que son sustituidos por un material PAS positivo, denominado membranas hialinas. Estas membranas, que son el signo más distintivo del DAD, están constituidas por fibrina y detritus procedentes de la destrucción de los neumocitos tipo I, tal como se aprecia en la microscopía electrónica.

La fase proliferativa se observa en la segunda semana y se caracteriza por la proliferación de los neumocitos tipo II que tapizan la superficie alveolar. En la microscopía electrónica se observan unos cuerpos lamelares que dan una imagen de reparación formada por células altas que recubren el interior del alveolo.

Finalmente, la fase de fibrosis se desencadena cuando el estímulo nocivo continúa y el proceso pulmonar mantiene su actividad produciendo un depósito de colágeno en el intersticio, ensanchándolo, al tiempo que disminuye el tamaño de los alveolos y los separa, produciéndose una fibrosis pulmonar que caracteriza las fases avanzadas del DAD [54] (Fig. 4).

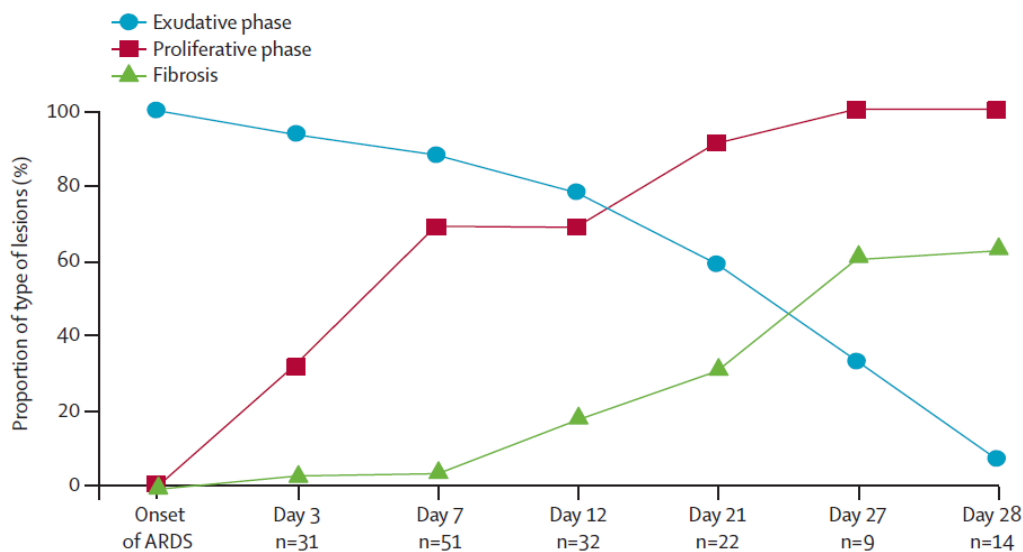
Figura 4. Relación entre la fase exudativa, proliferativa y fibrosis y duración del SDRA

La fase exudativa disminuye significativamente en el tiempo mientras que la fase proliferativa y la fibrosis fueron progresivamente aumentando en el tiempo. Más de una fase puede coexistir en un paciente. * $p=0.019$ para la fase exudativa, $p=0.0063$ para la fase proliferativa, y $p=0.0002$ para la fibrosis, comparada con la primera semana. † $p<0.0001$ para la fase exudativa, $p=0.0288$ para la fase proliferativa, y $p=0.0021$ para la fibrosis, comparado con la segunda y tercera semana. (Adaptado de [53])

Sin embargo la secuencia temporal de estos cambios, propuesta en su descripción original pero nunca documentada en pacientes con SDRA, ha sido recientemente demostrada por Thille y cols [53]. Se demostró que estos cambios son en efecto secuenciales en el tiempo, y que los cambios indicativos de inflamación y reparación pueden superponerse en el tiempo. De hecho es frecuente observar en el mismo paciente cambios correspondientes a diferentes fases evolutivas de la enfermedad.

El pronóstico del síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) ha mejorado espectacularmente en las últimas décadas, variando de una mortalidad intrahospitalaria del 90% en los años 70 (Zapol 1979) a aproximadamente un 30% en un estudio reciente [56]

Figura 5. Evolución de las lesiones histológicas en el tiempo en pacientes con SDRA



8. Tratamiento del DPA/SDRA

Para el manejo farmacológico del SDRA se han realizado ensayos clínicos en los cuales se ha probado la eficacia de la administración de agentes antiinflamatorios, anticoagulantes, surfactante exógeno, vasodilatadores, y agonistas β_2 . Sin embargo, los resultados han sido negativos, posiblemente debido a: (a) el proceso fisiopatológico es heterogéneo; (b) dificultad para identificar subgrupos de pacientes que pueden beneficiarse; (c) administración de dosis o utilización de una vía de administración inapropiadas.

Los intentos terapéuticos que han sido estudiados se resumen a continuación.

El conocimiento de la patogénesis ha permitido identificar nuevas dianas terapéuticas que pueden resultar de interés para el diseño de tratamientos eficaces en el DPA. Por ejemplo, HIF (hipoxia-inducible factor) y PHD 1-3 (oxygen –sensitive prolyl hydroxylases) intervienen en la regulación de la apoptosis de los neutrófilos, y pueden ser dianas para disminuir la inflamación en la fase temprana del SDRA [57]. Por otro lado, la elastasa y la IL-8 son liberados por los neutrófilos. Recientemente se han desarrollado inhibidores de la elastasa (sivelestad y AZD9668) [58]. Sivelestat disminuye la expresión de fosfo-SMD2/3, la cual se encuentra involucrada en el desarrollo de la fibrosis pulmonar [59, 60]. Se ha demostrado que el sivelestad mejora la función respiratoria, disminuye el reclutamiento de las células inflamatorias en la fase aguda y la deposición de colágeno en el parénquima pulmonar en la fase fibroproliferativa del SDRA.

Se han identificado moléculas que mantienen la función de la barrera endotelial reorganizando el esqueleto celular como los mediadores lipídicos esfingosina 1-p

(S1P) y resolvinas, estatinas, sistema angiopoyetina-1/2-Tie2 y la proteína C activada (APC, *activated protein C*) [61].

La S1P es un lípido bioactivo que actúa uniéndose a su receptor asociado a la proteína G, desencadenando la activación de vías de señalización de Rho y Rac1 para el ensamblaje de fibras de estrés, la unión de la actina a la membrana y la formación de adhesiones focales. Intervienen también los complejos de unión entre célula y célula mediante caderina, paxilina, cateninas, zona ocludens, para prevenir el aumento de la permeabilidad vascular. Estudios recientes demostraron que estimulando la producción de S1P (FTY720) o inhibiendo su degradación se reduce la permeabilidad vascular, se limita la ruptura de la microvasculatura endotelial, la formación de edema pulmonar y se atenúa la respuesta inflamatoria del parénquima pulmonar limitando el desarrollo del SDRA [62, 63].

Las resolvinas (Rv) tienen propiedades antiinflamatorias mediadas por la supresión del factor nuclear kappa B (NF- κ B) a través de los mecanismos que dependen en parte de los PPAR γ . RvD1 reduce significativamente la exocitosis de los macrófagos y de los neutrófilos, incrementa la expresión de las citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) y tienen propiedades antifibróticas y acciones antimicrobianas [64, 66].

Las estatinas confieren protección pulmonar preservando la función y la integridad del endotelio. El efecto protector está mediado por la sobreexpresión de la integrina β 4 en las células endoteliales [67].

El sistema angiopoyetina $\frac{1}{2}$ juega un papel importante en la sepsis y en el DPA. Ang-1 y Ang-2 se unen a receptores endoteliales y solubles. Ang-1 induce la activación del receptor Tie 2 endotelial, y reduce la inflamación pulmonar y la permeabilidad de las células endoteliales. Ang-2 impide la unión de la Ang-1 al receptor Tie 2 endotelial y consecuentemente da lugar a Ang-1/2-Tie 2 puede ser, por tanto, una diana para el tratamiento del SDRA [68, 69].

La proteína activada C (APC) es una proteína endógena que promueve la fibrosis e inhibe la trombosis, y modula la coagulación y la inflamación asociadas al DPA [71].

La enzima convertidora de angiotensina (ACE), la angiotensina 2 y el receptor tipo 1 (AT-1) de la angiotensina 2 inducen apoptosis en la pared alveolar, alteran la integridad de la barrera alveolocapilar y estimulan la deposición de colágeno, lo cual produce fibrosis pulmonar y disfunción pulmonar [72, 74].

Por el contrario, la ACE tipo 2 y el receptor de la angiotensina tipo 2 (ATE-2) protegen contra todos estos efectos. Además la inhibición de ACE y AT-1 aumentan la actividad de ACE 2 y AT-2 disminuyendo el daño pulmonar en varios modelos animales de estrés.

Otras vías que se han identificado como dianas terapéuticas son la señalización mediada por endotoxina. En modelos animales se demostró que un antagonista de TLR-4 protege el desarrollo de SDRA causado por la influenza [75]. Eritrosan se une a

CD14, e inhibe la unión del complejo MD2:TLR4, previniendo así la dimerización de TLR-4 y su activación [76]

El uso de antagonistas de las integrinas previene la adhesión de leucocitos a las células epiteliales, lo que protege a las mismas de la inflamación [77]. Estos fármacos han sido estudiados en diferentes patologías como el síndrome coronario agudo, la psoriasis, el asma y la EPOC. El uso en el SDRA está todavía pendiente de mayor desarrollo [76].

Algunos micro RNA (hsa-miR-374^a, hsa-miR-374b, hsa-miR-520c-3p, y hsa-miR-1290) están involucrados en la disfunción de la barrera endotelial, en el incremento del edema pulmonar y en la respuesta inflamatoria del pulmón. Con la modulación de estos microRNAs se podría obtener resultados beneficiosos para controlar el desarrollo del SDRA [78, 79].

En los modelos animales de DPA la administración de endotoxina ocasiona la liberación de histamina endógena, con el consiguiente reclutamiento de neutrófilos y aumento de la expresión de citoquinas e hiperpermeabilidad capilar. La administración de antagonistas del receptor H2 (ranitidina) disminuye la concentración de histamina [80, 81].

Se ha visto que la administración de ranitidina se asocia con una disminución significativa del número de neutrófilos y de la permeabilidad oncótica [81].

Finalmente se han utilizado técnicas de nanomedicina para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Por ejemplo se ha demostrado que las micelas fosfolipídicas biocompatibles y biodegradables de acción prolongada inhiben diferentes dianas de DPA [82, 83].

9. Modelos animales

Se ha diseñado modelos animales para el estudio de la patogénesis y de intervenciones potencialmente terapéuticas del DPA. Idealmente los modelos animales de DPA deben reproducir los mecanismos y consecuencias clínicas del síndrome de los seres humanos, incluyendo los cambios fisiológicos y patológicos que se producen. Sin embargo, ninguno de los modelos de DPA reproduce adecuadamente las características complejas del síndrome del DPA/SDRA humano, que se caracteriza por una alveolitis neutrofílica aguda con la formación de membranas hialinas y microtrombos intravasculares. En 2010 la American Thoracic Society (ATS), recomendó que los modelos animales ALI/DPA deben tener al menos 3 de las 4 siguientes características: evidencia histológica de daño tisular, alteración de la membrana alveolocapilar, presencia de respuesta inflamatoria y evidencia de disfunción fisiológica. Por lo tanto la elección de una modelo en particular se debe hacer después de considerar las características específicas de cada modelo.

Todos los modelos de DPA tienen sus limitaciones. La mayoría de los modelos se basan en uno o dos métodos para provocar daño. Sin embargo, el síndrome de DPA/SDRA humano es raramente causado por un solo evento. A menudo, el SDRA en humanos está asociado con interacciones complejas entre los factores de riesgo primarios, como la sepsis, comorbilidades, como la diabetes, el alcoholismo y la enfermedad pulmonar subyacente; y otros factores inherentes al huésped, como son los determinantes genéticos. Otro inconveniente de los modelos animales es que la variabilidad de la inmunidad innata entre especies y otras respuestas podrían afectar a la importancia de los datos obtenidos de los modelos animales para los seres humanos. Por último, la mayoría de los modelos se dirigen a un tejido primario, el epitelio alveolar, el endotelio alveolar, o ambos, pero el tejido diana principal en DPA/SDRA aún sigue siendo desconocido. Estas deficiencias solas o en combinación, son probablemente responsables del hecho de que los modelos animales a menudo han producido resultados diferentes o incluso contradictorios, y que los enfoques terapéuticos eficaces en animales no siempre tienen éxito en seres humanos. Sin embargo a pesar de estas limitaciones, los estudios que utilizan modelos animales de LPA/SDRA siguen siendo esenciales porque hasta la actualidad no existe otro medio para generar información sobre la fisiopatología de la lesión pulmonar y para poner a prueba las intervenciones terapéuticas en los sistemas biológicos complejos.

Para superar estas deficiencias, los investigadores deben prestar atención a la elección del modelo adecuado para poner a prueba su hipótesis y deben ser conscientes de las diferencias entre el modelo utilizado y el DPA/SDRA en humanos. Los modelos que se aproximan a las características del SDRA en humanos, al menos los observados durante la fase aguda, incluyen la inoculación del ácido oleico, la aspiración ácida y la hiperoxia. La naturaleza traslacional de estos modelos se encuentra fuertemente limitada por el tipo de insulto utilizado. Los animales no aspiran ácido oleico, la aspiración de contenidos gástricos no es responsable sino de una pequeña proporción de pacientes con SDRA, y la hiperoxia no se ha demostrado que sea causa de SDRA en humanos.

Otro modelo consiste en la realización de repetidos lavados broncoalveolares con suero salino para eliminar el surfactante y crear una situación de disminución de distensibilidad pulmonar y deterioro del intercambio gaseoso. Sin embargo este modelo no reproduce la lesión del epitelio alveolar o la alveolitis neutrofílica características del SDRA. Estos cambios se desarrollan en este modelo si se añade un segundo insulto como la administración de endotoxina bacteriana o la ventilación mecánica. La sepsis es una de las causas más comunes del SDRA en los seres humanos, pero los modelos de sepsis tratando a los animales por vía sistémica con bacterias o productos bacterianos se asocian generalmente con neutrofilia alveolar leve y con cambios mínimos en la permeabilidad capilar alveolar.

Hay muchas diferencias anatómicas y fisiológicas entre animales y humanos que pueden influir en la respuesta del pulmón a un daño agudo y afectar a la evaluación del daño pulmonar [84]:

1.- La frecuencia respiratoria (FR). La FR en un adulto humano oscila entre 12 y 16 rpm mientras que en un ratón se eleva a 250-300 rpm. Por tanto, el uso de este parámetro como indicador de daño pulmonar no es adecuado.

2.- La anatomía pulmonar. Los ratones y las ratas tienen diferentes anatomías lobares, y pocas vías aéreas que conducen de los bronquiolos proximales a los terminales. Asimismo los alveolos y el grosor de la barrera alveolocapilar son más pequeños que los de los humanos.

3.- La inflamación. Los roedores tienen pocos neutrófilos circulantes (10-25%) comparado con los humanos (50-70%) y no expresan defensinas. Las quimioquinas producidas por los neutrófilos son diferentes en humanos y en roedores. La CXCL1 y la MIP-2 aparecen en roedores y la IL-8 en humanos.

4.- Lesiones histológicas en el DPA. En pulmones murinos rara vez se encuentran membranas hialinas en situaciones de aumento de permeabilidad.

5.- Desarrollo del DPA. En humanos, el DPA se desarrolla en pacientes afectados por otra enfermedad que es el factor de riesgo del SDRA (más frecuentemente la sepsis) mientras que en los modelos animales frecuentemente se usan ratones jóvenes sin comorbilidades.

Por todas estas razones las respuestas de los pulmones de los animales y de los humanos a un estímulo dañino no se puede esperar que sean idénticas o incluso similares.

Tabla 2. Porcentaje de los diferentes modelos animales usado en el estudio de daño pulmonar agudo

MODELOS ANIMALES DE DAÑO PULMONAR AGUDO	%
Ventilación mecánica	30
LPS	19
Bacterias vivas	16
Hiperoxia	12
Bleomicina	10
Ácido oleico	5
Punción y ligadura cecal	4
Aspiración ácida	3

Tabla modificada de la referencia [85].

10. Daño pulmonar asociado a la ventilación mecánica (VILI)

Recientemente se ha puesto de manifiesto que la ventilación mecánica con una presión de la vía aérea (P_{VA}) elevada induce una condición caracterizada por inflamación aguda, edema pulmonar por hiperpermeabilidad alveolocapilar, hipoxemia y cambios histológicos consistentes con DAD. Es decir la ventilación mecánica con P_{AV} elevadas induce una condición indistinguible del DPA/SDRA. Esta condición ha recibido el nombre de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica, al que nos referimos en adelante, por la gran difusión del acrónimo, como VILI (*ventilator induced lung injury*) [1, 2, 86-89]

La importancia de VILI como posible mecanismo de daño pulmonar en pacientes en ventilación mecánica ha sido demostrada por un ensayo clínico en el que se comprobó que la ventilación mecánica utilizando un V_T Bajo (6 versus 12 ml/kg) reducía en un 22% la mortalidad de pacientes con DPA sometidos a ventilación mecánica [90, 91].

Determinantes del VILI: papel del volumen teleinspiratorio pulmonar

El término “*barotrauma*” fue inicialmente usado para describir el daño pulmonar atribuible a la ventilación con presiones pico en la vía aéreas altas. La lesión más frecuente que causa es el neumotórax [92]. Sin embargo, Dreyfuss y Saumon demostraron que dichas lesiones no eran causadas con la presión de la vía aérea *per se* sino por las amplias variaciones de volumen a que eran sometidas los pulmones durante la ventilación, y propusieron que el término de barotrauma fuera reemplazado por “*volutrauma*”.

Para diferenciar entre los efectos de la distensión pulmonar y la presión de la vía aérea, se compararon ratas ventiladas con idénticas presiones pico (45 cm H_2O) pero usando V_T Bajo o V_T Alto (generado por la limitación de los movimientos toracoabdominales mediante una banda compresiva) [3].

Las ratas ventiladas con V_T altos desarrollaban edema pulmonar mientras que no ocurría en las que se ventilaba con V_T Bajos. Las altas presiones no eran un factor de riesgo para el desarrollo del edema pulmonar, lo que fue confirmado al ventilar ratas con volúmenes altos pero presiones negativas en la vía aérea mediante un pulmón de acero [3]. Estos hallazgos se han reproducido en conejos [93] y corderos[94].

También se cuestionó si el edema pulmonar durante la ventilación mecánica ocurría al sobrepasar un determinado volumen. Fueron Carlton y cols [94] quienes respondieron con un modelo de VILI en cordero. Al aumentar progresivamente el V_T también aumentaban las presiones tele inspiratorias a 16, 33, 43 y 61 cm H_2O .

Estos autores también demuestran que el flujo linfático y la concentración de proteínas se incrementaban sólo con el volumen tidal más alto (57 ml/kg) alcanzando un nivel de

presión de 61 cm H₂O, lo que sugería que las alteraciones microvasculares en respuesta a la sobredistensión ocurren al sobrepasar un límite de volumen y presión más que de forma gradual [94].

Estos hallazgos fueron confirmados por escintigrafía que permite evaluar los cambios simultáneos en la permeabilidad alveolar y microvascular durante la distensión en ratas con pulmones previamente sanos [95]. Así se observaban cambios en la permeabilidad epitelial y endotelial con el mismo límite de presión teleinspiratoria (de 20 a 25 cm H₂O correspondiendo a V_T de 13.7±4.69 y 22.2±1.12ml/kg).

El hecho de aumentar el volumen teleinspiratorio mediante un incremento de la capacidad residual funcional (por ejemplo aplicando la PEEP) puede causar daño independientemente del V_T aplicado. Por lo cual, la aplicación de la PEEP cuando el V_T permanece constante aumenta el volumen teleinspiratorio y esto puede ser perjudicial.

Por ello las ratas ventiladas con un V_T en el rango fisiológico desarrollan edema pulmonar cuando se aplica una PEEP de 15 cm H₂O y no de 10 cm H₂O [96]. Asimismo, en modelos animales se observó que no se produce daño cuando se dobla el V_T ventilando con PEEP=0, pero desarrollan edema pulmonar cuando se usa PEEP de 10 cm H₂O.

La aplicación de la PEEP atenúa el daño pulmonar cuando el volumen teleinspiratorio permanece constante. Esto puede estar relacionado con una reducción del V_T y la estabilización de los alveolos distales. Weeb y Tierney demostraron que al aplicar una presión teleinspiratoria de 45 cm H₂O y una PEEP de 10 cm H₂O, el edema era menos grave, y atribuyeron este efecto al mantenimiento de la actividad del surfactante [1]

Más tarde se confirmó que al ventilar ratas con la misma presión teleinspiratoria (45cm H₂O) y PEEP=0 desarrollaban mayor edema pulmonar (objetivado por las medidas del agua extravascular pulmonar) que aquellas que eran ventiladas con PEEP. Sin embargo, la presencia de PEEP también desarrollaba edema que no ocupa el alveolo sino que está confinado al intersticio [3].

La aplicación de la PEEP cuando se desarrolla VILI se asocia a la preservación del epitelio alveolar y las únicas anomalías microestructurales observadas fueron edema intersticial y un proceso apoptótico manifestado por la vacuolización del citoplasma a nivel del endotelio [3].

Este fenómeno beneficioso de la PEEP puede estar relacionado con la reducción de la distensión pulmonar, que evita el efecto abrasivo sobre el espacio intercelular del epitelio [88, 89]. Existe la hipótesis de que el fenómeno de apertura y cierre cíclico de unidades alveolares explica el daño pulmonar en el VILI [97-99]

La hipótesis del biotrauma

Se ha propuesto que el daño pulmonar observado en el contexto de VILI se debe al desarrollo de la respuesta inflamatoria por un mecanismo de mecano transducción, que transduce la señal mecánica (P_{VA} elevada) en una señal inflamatoria. Numerosos estudios han demostrado que la ventilación mecánica usando presiones pico en la vía aérea elevadas se asocia con infiltrado pulmonar de neutrófilos [99, 100]. Además la depleción de neutrófilos se asocia con un mejor intercambio gaseoso y menor lesión pulmonar, como se observó en un modelo de DPA inducido por déficit de surfactante pulmonar en conejos [101]. Con esto se insinúa que la reacción inflamatoria *per se* puede ser perjudicial. Por otra parte hay evidencias de que la ventilación mecánica podría ocasionar efectos a nivel sistémico. Kolobow y cols demostraron que ovejas ventiladas con presión pico de 50 cm H₂O (lo que corresponde a V_T de 50 a 70 ml/kg), morían de fallo multiorgánico en las siguientes 48 horas [102]. Tremblay y cols [6], en el modelo de exvivo de pulmones de ratas ventilados con $V_T=40$ ml/kg y PEEP=0 sin perfundir, encontró en el LBA un incremento de TNF- α , IL-1 β y MIP-2), en comparación con los controles. Esto sugiere que la ventilación mecánica podría influir en el equilibrio inflamatorio/ antiinflamatorio a nivel pulmonar.

Sin embargo, otro grupo usando el mismo modelo encontró sólo un ligero aumento de IL-1 β y MIP-2, sin cambios en el TNF- α , en el LBA de pulmones de rata ventilados con $V_T=42$ ml/kg en comparación con las ventiladas con $V_T=7$ ml/kg [103, 104]. Concluyendo que el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica no sólo es causado por la producción primaria de citoquinas proinflamatorias a nivel pulmonar [104]. Las dos principales hipótesis han intentado resolver sus discrepancias. Es posible que el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica sea insuficiente *per se* para estimular una secreción intensa de citoquinas proinflamatorias, pero suficiente cuando está asociado a otra agresión [105, 106].

De hecho la asociación de shock hemorrágico (y la resucitación subsiguiente) y la ventilación con presiones pico elevadas constituyen al aumento de secreción de citoquinas proinflamatorias tanto a nivel pulmonar como sistémico.

La hipótesis del biotrauma encuentra un apoyo al descubrirse que los pacientes con SDRA ventilados con una estrategia protectora ($V_T=7$ ml/kg y PEEP=15 cm H₂O) muestran menor concentración de citoquinas pro-inflamatorias tanto en el plasma como en LBA en comparación a los ventilados con estrategia control ($V_T=7$ ml/kg y PEEP=15 cm H₂O) muestran menor concentración de citoquinas pro-inflamatorias tanto en el plasma como en el LBA en comparación a los ventilados con la estrategia control ($V_T=11$ ml/kg, PEEP=6 cm H₂O) en sólo 36 horas tras la aleatorización [107].

En pacientes con SDRA ventilados con 6 ml/kg se encontró en el plasma pequeñas diferencias aunque significativas en los niveles de IL-6 e IL-8 en comparación a los ventilados con 12 ml/kg [108]. Por el contrario, los cambios transitorios en la estrategia ventilatoria de V_T Bajo + PEEP alta ($V_T=5$ ml/kg, PEEP=15 cmH₂O) a V_T Alto + PEEP baja ($V_T=12$ ml/kg, PEEP=5 cm H₂O) en pacientes con DPA desencadenaban un aumento de los niveles de citoquinas en el suero y en el LBA [109, 110].

Por último, hay pruebas que sugieren que una estrategia ventilatoria nociva puede contribuir a la diseminación sistémica de una carga bacteriana y a la extensión del edema pulmonar [10]. De hecho, la ventilación con V_T elevado y PEEP=0 favorece la siembra bacteriana contralateral en un modelo unilateral de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa* en ratas [111].

Mediante instilación de albúmina marcada con ^{99}TC a través de la vía aérea distal se observó que tras iniciar la ventilación mecánica con V_T elevado casi inmediatamente el edema se diseminó, respuesta que se atribuye a los movimientos convectivos producidos por esta estrategia ventilatoria. La aplicación de la PEEP evitaba la diseminación aun cuando el V_T y la PIP eran elevadas.

Cambios microscópicos

El daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica, tema central del presente trabajo de investigación, se asocia con cambios histológicos semejantes a los descritos para el SDRA en general, como se discutirá en detalle en la sección sobre cambios histológicos de la presente Introducción.

Los pulmones lesionados por la ventilación mecánica presentan atelectasias, y congestión grave debido al edema, a los cambios epiteliales y endoteliales y a la hiperpermeabilidad alveolocapilar. Se han descrito cambios histológicos característicos de DAD. El DAD es el conjunto de cambios histológicos que se encuentran en pacientes con SDRA, y consiste en edema, inflamación, engrosamiento de la pared alveolocapilar, hemorragias y formación de membranas hialinas.

Tsuno y cols [99] demostraron en cerdos ventilados con alta presión durante 22 horas cambios consistentes con DAD, incluyendo formación de membranas hialinas, hemorragias alveolares e infiltración de neutrófilos.

También en estudios usando modelos animales pequeños sometidos a ventilación mecánica con altas presiones [2, 3, 112, 113] se ha observado destrucción de las células alveolares tipo I (ATI) y exposición de la membrana basal, ocupación del espacio alveolar por membranas hialinas, alteraciones de las células endoteliales (despegamiento de la membrana basal y formación de vacuolas intracapilares), así como roturas de células endoteliales, permitiendo el contacto directo entre los neutrófilos y la membrana basal.

Existe una relación entre la duración y la gravedad del daño histológico. En animales pequeños el edema se desarrolla rápidamente, mientras que en animales grandes se necesitan varias horas para que desarrolle una respuesta inflamatoria y aparezca edema [99, 101]

VILI y respuesta inflamatoria pulmonar

Los mediadores específicos implicados en la respuesta inflamatoria característica del VILI no son bien conocidos. El daño y reparación es un delicado equilibrio entre las citoquinas pro y anti-inflamatorias [114-116]

La naturaleza del daño pulmonar es el factor más importante que marca si el sistema inmune se dirige hacia una respuesta de tipo I o tipo II [117-118]. Dirigir la respuesta del huésped de un tipo de respuesta inmune a otro puede ser beneficioso durante el DPA/SDRA. Se ha demostrado que ambos tipos de respuesta inmune, el tipo I (e.g; TNF- α , IL-1 β) y el tipo II (e.g; IL-6, IL-10) están aumentados en el VILI [4, 119].

TNF- α

Los modelos animales han demostrado que el TNF- α juega un papel esencial en la respuesta fibroproliferativa durante el DPA.

Tremblay y cols. llevaron a cabo estudios usando un modelo de pulmón no perfundido ventilado *ex vivo* [4], pre-tratados con LPS i.v. Los pulmones (pre-tratados o no con LPS) eran aleatorizados y sometidos a 4 estrategias ventilatorias durante 2 horas: (1) no lesivo ($V_T=7\text{ml/kg} + \text{PEEP}=2 \text{ cmH}_2\text{O}$); (2) daño moderado ($V_T=15\text{ml/kg} + \text{PEEP}=10 \text{ cm H}_2\text{O}$); (3) daño intermedio ($V_T=15\text{ml/kg} + \text{PEEP}=0 \text{ cmH}_2\text{O}$); (4) estrategia lesiva ($V_T=40 \text{ ml/kg} + \text{PEEP}=0 \text{ cmH}_2\text{O}$). Sólo los grupos de ventilación 3 y 4 (pre-tratados y no pre-tratados con LPS) desarrollaron una reducción significativa de la compliance pulmonar y una elevación de citoquinas pro-inflamatorias dependiente de la estrategia ventilatoria utilizada. El grado de daño (teniendo en cuenta la compliance) era similar entre el grupo de LPS y el grupo control [4]. Estos resultados concordaban con otros modelos animales de VILI y confirmaban el estudio de Ranieri y cols [119].

El papel fundamental de TNF- α en la patogénesis de VILI fue apoyado posteriormente por estudios de Imai y cols [120], en los que se demostró que conejos sometidos a $V_T=12-15 \text{ ml/kg} + \text{PEEP}=5 \text{ cm H}_2\text{O}$ aumento de TNF- α en LBA y mejoría del VILI mediante la administración intratraqueal de anticuerpos anti TNF- α ,

Los estudios que demuestran translocación de citoquinas desde el pulmón a la circulación durante el daño pulmonar [8-10, 121-123] proporcionan fundamento para la hipótesis de que VILI se puede asociar con disfunción de órganos no pulmonares.

Ranieri y cols, objetivaron la influencia de diferentes estrategias de ventilación mecánica en la secreción de citoquinas en pacientes con SDRA [119, 124]. Se reclutaron pacientes con SDRA y se aleatorizaron en 2 grupos: (a) V_T para obtener valores normales de PaCO₂ sin exceder la presión meseta de 35 cm H₂O, y la PEEP ajustadas para conseguir una mejora en la saturación de oxígeno pero sin causar un trastorno hemodinámico; (b) V_T y PEEP ajustados según los valores mayores o menores de inflexión de las curvas de volumen/presión, respectivamente. Las características fisiológicas de los pacientes y los niveles de TNF- α eran similares en ambos grupos al inicio del estudio. Sin embargo, el grupo (a) tenía un V_T y una PIP

mayores y una PEEP y $p\text{CO}_2$ menores que el grupo de (b). Tras 36 horas de ventilación mecánica, el grupo (a) presentaba concentraciones mayores de TNF- α y de los receptores solubles de TNF- α (tipo I y II) tanto en el plasma como en LBA que el grupo (b). Este estudio pone de relevancia la liberación de citoquinas en el VILI. Estos resultados deben ser usados con cautela por el hecho de que el grupo (b) presentaba unos niveles de PCO_2 mayores, lo cual inhibe la liberación de citoquinas y atenúa el daño pulmonar [125-127].

Finalmente, estudios en humanos han demostrado niveles bajos TNF- α tanto en el plasma, como en el LBA de pacientes con riesgo de padecer SDRA muestran un excelente valor predictivo negativo para el desarrollo de SDRA [119]. En conjunto estos estudios demuestran que niveles elevados de TNF- α se asocian con ALI/SDRA y que puede ser un biomarcador que predice los pacientes críticos que desarrollarán ALI/SDRA.

IL-1 β

IL-1 β es una citoquina que aparece precozmente en la respuesta inflamatoria, al igual que el TNF- α . Se han encontrado niveles elevados de IL-1 β y de su inhibidor IL-1Ra en el LBA de pacientes con SDRA. Concretamente, la proporción de IL-1 β /IL1Ra es de 10:1 molar en el BAL de los pacientes con SDRA frente a la proporción de 1:1 en voluntarios sanos [128].

El estudio de Ranieri y cols antes mencionado demostró también un aumento de IL-1 β y IL1Ra en LBA en pacientes sometidos a V_T elevado.

Los estudios llevados a cabo por Tremblay y cols. en su modelo *ex vivo* [4] demostraron un aumento transitorio de los niveles de IL-1 β en LBA paralelamente al grado de VILI. Ricard y cols, [104] encontraron los mismos resultados en sus modelos *ex vivo* e *in vivo* de rata. Copland y cols [129] ampliaron estos estudios y demostraron que la IL-1 β estaba localizada en el epitelio broncoalveolar durante el VILI.

IL-6

IL-6 es una citoquina con propiedades pro y antiinflamatorias y se asocia a la respuesta inmune tipo II. IL-6 es producida por muchas células, incluidos fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y células del músculo liso. En el SDRA, los niveles circulantes de IL-6 son predictivos de su gravedad [130-132]. Ranieri y cols [119] demostraron que los pacientes con SDRA ventilados con V_T elevado desarrollaban un aumento de los niveles de IL-6 tanto en el plasma como en LBA a las 40 horas.

Modulación de VILI

Se han publicado resultados experimentales prometedores que sugieren que se puede suprimir la interfase aire-líquido y permitir la reapertura de la áreas llenas de líquido o

colapsadas mediante la administración de surfactante exógeno [133] y de ventilación líquida con perfluorocarbonos [133]

La administración de surfactante sintético ha fracasado al no mejorar la oxigenación [134] y la mecánica pulmonar en pacientes con SDRA [135, 136]. El uso de líquidos con perfluorocarbonos tanto con V_T bajos (10ml/kg) o altos (20ml/kg) no ofreció mejoría en pacientes con SDRA [137, 138].

La posición prona es otra estrategia que potencialmente puede disminuir el VILI en pacientes. Tras dos estudios negativos en pacientes con SDRA [139, 140] más recientemente se ha demostrado que la pronación se asocia a una mayor supervivencia si se utiliza de forma precoz en pacientes con $PaO_2/FiO_2 < 150$ [141-142]. Estos resultados concuerdan con estudios experimentales [143]. Este efecto protector probablemente esta en relación con una distribución más homogénea de la ventilación en pacientes pronados [144]

Otras estrategias ensayadas para modular el VILI son de tipo farmacológico, incluyendo la modulación de la permeabilidad microvascular usando bloqueantes de canales de cationes activados en respuesta al estiramiento [145] o agonistas β adrenergicos [146], la administración de inhibidores de fosfotirosina quinasa [147], o la reducción de la fosforilación de la cadena ligera de miosina con la adrenomodulina [148].

Ensayos que intervienen en la modulación del desequilibrio entre mediadores inflamatorios/antiinflamatorios en el pulmón. De hecho la administración de los anticuerpos anti- TNF α y la inhibición de la actividad de MIP-2 reduce la infiltración de neutrófilos y del daño pulmonar [120, 149, 150]

Moduladores de las vías hormonales y metabólicas usando inhibidores del sistema renina angiotensina [151, 152] y el pretratamiento con estatinas (artorvastatina o simvastatina) [153, 154] que disminuyen la permeabilidad alveolocapilar y la inflamación a nivel pulmonar en los modelos experimentales de VILI. Sin embargo ninguna de las intervenciones ha resultado ser beneficiosa para la prevención y tratamiento de VILI en pacientes.

11. Bacterias intestinales y respuesta inmune

Intestino y sistema inmune

El tracto gastrointestinal constituye una fase de contacto y comunicación entre el individuo y el medio externo [155]. El aparato inmunológico intestinal defiende al organismo de bacterias, virus parásitos y diversos antígenos. El tracto gastrointestinal del humano tiene tejido linfoide en abundancia. Más del 80% de las células que producen inmunoglobulinas están localizadas en la mucosa intestinal.

La gran superficie de la mucosa (300-400 metros cuadrados, considerando la superficie total con criptas y vellosidades desplegadas) está adaptada a las principales funciones del intestino, que no sólo incluyen los procesos bien conocidos que dan lugar a la digestión de los alimentos y a la absorción de los nutrientes, sino también una serie de actividades cuyo objetivo es establecer un equilibrio adecuado con el medio externo. Para ello, el sistema tiene que distinguir claramente entre patógenos o patógenos potenciales, y microbios comensales en simbiosis con el huésped. En el primer caso, el organismo debe dotarse de elementos de defensa adecuados, mientras que en el segundo caso, el huésped debe obtener beneficio de la simbiosis. Las interacciones entre los microorganismos, el epitelio y los tejidos linfoides intestinales son múltiples, diversas en sus características y continuas, de modo que remodelan constantemente los mecanismos locales y sistémicos de la inmunidad adaptándolos al ambiente microbiano [156].

La célula epitelial juega un papel importante en la logística del sistema inmune. Su posición en primera línea y en contacto con la luz intestinal es crucial para el reconocimiento inicial de moléculas foráneas y o para la generación de señales que se transmiten a las células inmunocompetentes del tejido subyacente. La activación de los mecanismos de defensa depende en primer lugar del reconocimiento rápido a través de receptores innatos o preformados que detectan componentes estructurales conservados y comunes a bacterias o virus, pero ausentes en la célula eucariota. Esto se realiza en el medio extracelular mediante los *toll-like-receptor* (TLR) de la membrana y en el medio intracelular mediante las proteínas tipo NOD del citosol [157]. La activación de estos sensores por invasión bacteriana genera inmediatamente señales que convergen en la migración de factores de transcripción (NF-kappa B y otros) al núcleo celular donde activan la expresión de genes responsables de la síntesis de proteínas pro-inflamatorias [158], básicamente citoquinas y enzimas inducibles con capacidad para generar eicosanoides y óxido nítrico. De este modo, las células epiteliales comienzan a liberar mediadores inflamatorios con capacidad de atraer y activar leucocitos, aumentar el flujo sanguíneo, incrementar la permeabilidad capilar, etc. Los enterocitos pueden expresar moléculas MHC de clase II y de clase I tipo no-clásico, de modo que en determinadas circunstancias también pueden actuar como células presentadoras de antígenos: su función no se limita a la defensa innata sino a que estas células también participan en el escalón inicial de las respuestas del sistema inmune adquirido (expansión de clones linfocitarios específicos y generación de anticuerpos) [158]

La mucosa del tracto intestinal tiene una alta proporción de tejido linfoide que se localiza en tres compartimentos diferenciales: estructuras organizadas (placas de Peyer y folículos linfoides), lámina propia y epitelio superficial [159]. Las estructuras organizadas son lugares de inducción, mientras que la lámina propia y el compartimento epitelial contienen células maduras y efectoras. Las estructuras organizadas están cubiertas por epitelio organizado (contiene células M, llamadas así por su morfología característica), que transporta microorganismos o estructuras antigénicas desde la luz hasta el tejido linfoide subyacente. Por tanto, la inducción de respuestas inmunes de tipo adquirido tiene lugar fundamentalmente en estas

estructuras foliculares. Los antígenos procesados se presentan a linfocitos T en estado “naive”, y se activa la expansión de los clones más afines a l antígeno. La expansión clonal de células T pueden dar lugar a linfocitos “helper” (células Th) de distinto fenotipo: Th1, Th2 o T reguladoras (Th3, Tr1 o células CD4-CD25). Las células T reguladoras desempeñan un papel en la inmunotolerancia porque segregan citoquinas reguladoras, de carácter antiinflamatorio (IL-10, TGF-β), en respuesta a antígenos que se conocen como “comensales” y no patógenos [160, 161]. Los linfocitos T *helper* participan también en la selección y activación clonal de células B antígeno específicos para su diferenciación en plasmocitos que segregan anticuerpos específicos (predominantemente de tipo Ig A). Las células B y T primero migran a los ganglios mesentéricos por vías linfáticas hasta que alcanzan la circulación sanguínea y se distribuyen por el organismo para terminar alojándose en áreas efectoras, como la lámina propia y el epitelio intestinal.

La inmunidad normal de la mucosa se basa en la secreción de la Ig A producida por los linfocitos B (plasmocitos) alojados en la lámina propia. Esta inmunoglobulina neutraliza los antígenos en la luz, un procedimiento que se conoce como inmunoexclusión o inmunoeliminación [159]. Al repeler el material extraño en la superficie epitelial se evita la reacción inflamatoria en el tejido. En condiciones normales, la mucosa intestinal contiene muy pocos plasmocitos productores de IgG, y hay muy pocas células T activadas. Este concepto de inmunotolerancia permite la exposición continua a una carga antigénica abrumadora (bacterias de la microbiota, comida), sin que por ello se desencadenen reacciones inflamatorias que lesionarían el tejido intestinal propio.

La interacción con el mundo microbiano en la luz intestinal va poco a poco iniciando todos los mecanismos inmunitarios adquiridos, entre ellos el estado de inmunotolerancia activa mediado por células T reguladoras [160, 161]. Algunas anomalías en el desarrollo del sistema inmune podrían deberse a defectos en la interacción de la microbiota con los compartimentos inmunocompetentes de la mucosa. De acuerdo con la “hipótesis de la higiene”, en las sociedades accidentalizadas la incidencia cada vez mayor de atopias (eczemas, asma, rinitis, alergias) y enfermedades autoinmunes podría explicarse por una disminución de la carga microbiana en los primeros meses de vida. Hay evidencias que sugieren que la exposición a microorganismos no patógenos, incluyendo helmintos, transmitidos por los alimentos y por vía orofecal ejerce un impacto homeostático [161].

Citoquinas y mediadores de la inflamación en el intestino

Las citoquinas desempeñan un papel importante en la inmunidad intestinal (cuadro 2). Las quimioquinas son citoquinas de bajo peso molecular que estimulan el movimiento de los leucocitos y regulan su migración desde la sangre a los tejidos. Lo conforman las familias CXC y CC.

En la inflamación la CXC tienen actividad quimioatrayente y quimiotáctica sobre los neutrófilos y las CC sobre los monocitos, los linfocitos y los eosinófilos. Ambas familias

son producidas por los leucocitos, y por varios tipos de células tisulares, tales como las células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos.

Las células de la superficie de la mucosa intestinal son consideradas sensores de la infección bacteriana y proporcionan señales tempranas para la iniciación de la respuesta inflamatoria de la mucosa [162], y tienen la capacidad de síntesis de numerosas citoquinas (*vide infra*).

La flora intestinal interacciona con el enterocito en la respuesta inflamatoria. Por ejemplo el butirato, un ácido graso de cadena corta producto de la fermentación de carbohidratos no absorbidos, regula la expresión de MIP-2 en las células epiteliales. *In vivo* se demostró que el LPS y las citoquinas proinflamatorias también promueven la expresión de MIP-2, no observado en epitelio sano.

IL-8, una CXC, aumenta rápidamente en las células epiteliales de la superficie de la mucosa intestinal ante una infección bacteriana, induce la migración de leucocitos y actúa en conjunto con las integrinas favoreciendo la adhesión celular. Es estimulada principalmente por TNF- α y la IL-1 para reclutar los leucocitos en los focos de la inflamación.

MCP-1, MIP-2, RANTES y eotaxina, representantes de la familia CC, también participan en los procesos inflamatorios de la mucosa intestinal. El TNF- α es producido por los fagocitos mononucleares y las células T, y es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a la endotoxina bacteriana.

También es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves. El TNF- α puede estimular la síntesis de proteínas en la fase aguda a nivel hepático. Muchas actividades biológicas de esta citoquina pueden ser incrementadas por IFN- γ . Por lo tanto el TNF- α juega un papel importante en la inflamación de la mucosa.

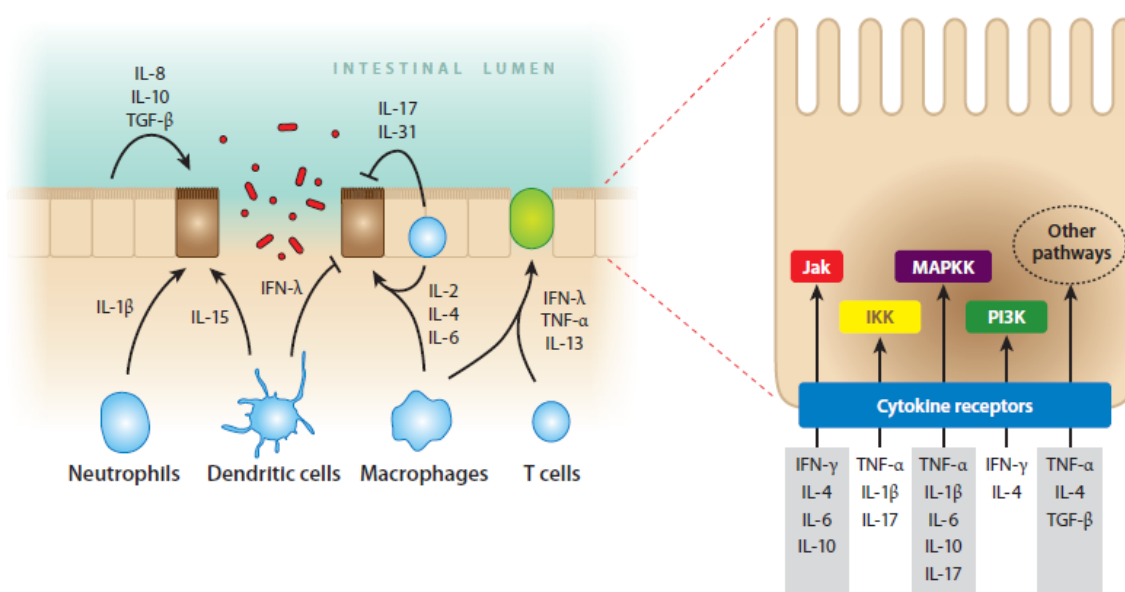
IL-1 es producida en la mucosa intestinal por los fagocitos mononucleares, las células dendríticas, los fibroblastos y las células endoteliales activadas. Actúa sobre diferentes tipos de células que participan en la respuesta inflamatoria [163]. Por ejemplo la IL-1 es un co-estimulador de las células T CD-4 y estimula a los fagocitos mononucleares y al endotelio vascular para producir IL-6 e IL-8 [164]. También estimula la síntesis de prostaglandinas y degrada enzimas como la colagenasa. Puede incrementar la adhesión de macrófagos y neutrófilos a las células endoteliales. Sistemáticamente IL-1 provoca fiebre y estimula la síntesis de las proteínas de la fase aguda por los hepatocitos.

IL-6 es producida por los fagocitos mononucleares, los fibroblastos, las células T, las células endoteliales vasculares y las células del epitelio intestinal [162, 165]. En la inmunidad adaptativa la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos. En la inmunidad innata, la IL-6, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda de los hepatocitos. La IL-1 y TNF- α pueden estimular a las células para que secreten la IL-6.

Las citoquinas IL-17 y IL-22 inducen un fortalecimiento de la barrera epitelial en situaciones de inflamación aguda [166] El activador prototípico de la IL-6 es STAT. IL-22 ejerce su efecto proliferativo por señalización a través de STAT3. Grivennikov y cols [167], han encontrado que la activación persistente de STAT 3 por IL-6 no promueve únicamente la proliferación celular sino también protege a las células premalignas de apoptosis en la colitis asociada al cáncer.

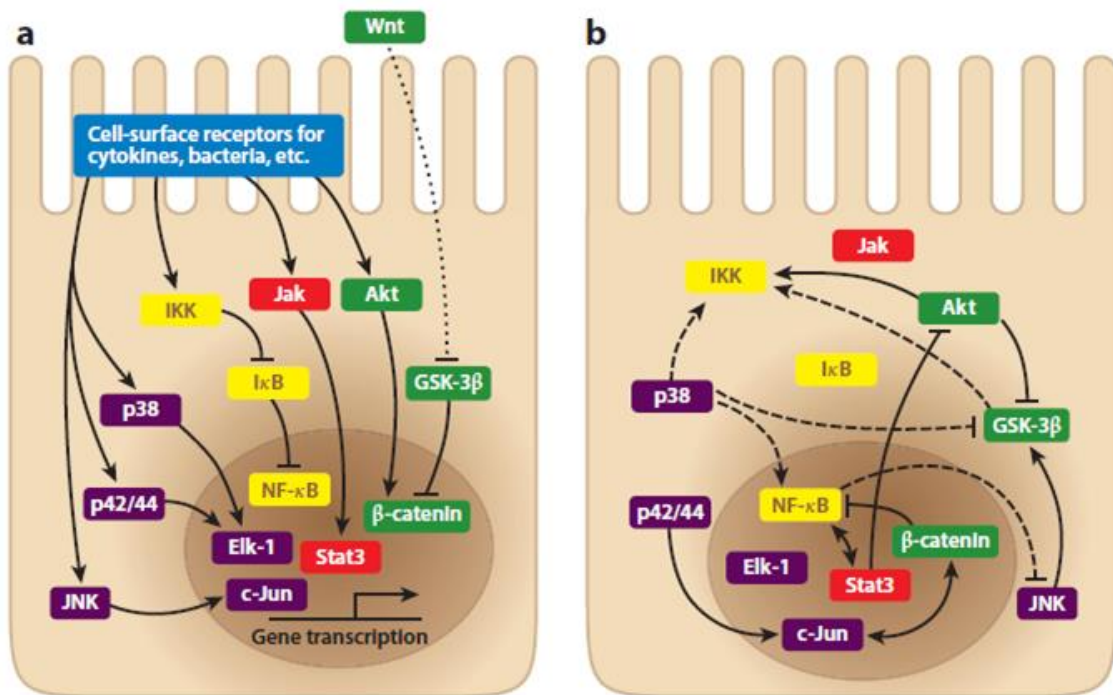
Estos autores también observan que la inducción de IL-6 es dependiente de NF- κ B y podría ser inhibida por anticuerpos anti-TNF- α . Por lo tanto, es probable que la inflamación de larga duración con niveles crónicos de elevación de citoquinas, transformadas a células cancerosas en formación, pueden permanecer en un “nicho de protección” en el cual se evade la vigilancia inmune normal.

Figura 5.



Las citoquinas inflamatorias regulan la homeostasis de las células epiteliales intestinales durante la inflamación. Las brechas de la barrera endotelial causa translocación bacteriana al compartimento tisular subepitelial, y posteriormente una respuesta inmune pronunciada. Las citoquinas inflamatorias secretadas por todas las células implicadas en la presentación del antígeno actúan modulando la respuesta inmune en el epitelio promoviendo o inhibiendo la proliferación (marrón) y apoptosis (verde). Las vías de señalización que se activan por las principales citoquinas inflamatorias se describen en la derecha. Abreviaturas: **IFN**, interferón. **IKK**, inhibidor de κ B kinasa. **IL**, interleuquina. **Jak**, Janus kinasa. **MAPKK**, mitógeno activado por la proteína kinasa. **PI3K**, fosfatidilinositol 3-kinasa; **TNF**, factor de necrosis tumoral. **TGF**; Factor de crecimiento transformante.

Figura 6.



Esquema de las principales vías de señalización involucradas en la iniciación y resolución de la inflamación.

a.- Las señales extracelulares (citoquinas, quimioquinas y productos bacterianos) son reconocidos por los receptores de la membrana epitelial celular que activan distintos mediadores de señalización. Este proceso conduce a la activación y reclutamiento de factores de transcripción que regulan la transcripción génica en respuesta a estímulos extrínsecos.

b.- Se ha demostrado de que las vías de señalización no son lineares y estáticas, sino más bien estar interconectadas en varios puntos entre la membrana celular y el núcleo. Las interferencias que se han reportado en las células epiteliales se indican mediante líneas continuas, y los informes adicionales de otros tipos de células se indican mediante células discontinuas. Abreviaturas: **GSK**, glicógeno sintasa kinasa. **IKK**, inhibidor de κB (IκB) kinasa; **Jak**, Janus kinasa. **JNK**, c-Jun N-terminal kinasa. **NF-κB**, factor nuclear κB. **Stat**, transductor de señal y activador de la transcripción.

Tabla 3. Citoquinas que regulan la homeostasis y su función en las células epiteliales intestinales en mamíferos

Citoquinas	Fuente primaria	Efectos sobre las células epiteliales intestinales	Patrón de señalización
IL-1 β	Neutrófilos, Mθ	Proliferación \uparrow, función de barrera \downarrow; induce IL-8	NF-κ B
IL-2	IEL	Proliferación \uparrow , migración \uparrow	Jak/Stat, Akt, MAPK
IL-4	IEL	Proliferación \uparrow , función de la barrera \downarrow , trans migración de neutrófilos \downarrow , induce receptores poliméricos Ig	Jak/Stat, Akt, MAPK
IL-6	IEL, Mθ	Proliferación\uparrow, apoptosis\downarrow, diferenciación\downarrow, transformación maligna	Jak/Stat, NF- κB, MAPK
IL-8	EC	Migración\uparrow	MAPK, PI3K
IL-10	EC, Mθ	Suprime citoquinas pro-inflamatorias; induce factor de crecimiento nervioso	Jak/Stat, Akt, MAPK
IL-11	Células del estroma	Proliferación \uparrow ? \downarrow ?, apoptosis \downarrow	Jak/Stat, MAPK
IL-13	CD4+ Células T	apoptosis \uparrow , migración \downarrow , función de barrera \downarrow	Jak/Stat
IL-15	M θ , DC	Proliferación \uparrow , apoptosis \downarrow \uparrow ?	Jak/Stat
IL-17	IEL	Proliferación \downarrow , función de barrera \uparrow	NF- κ B, MAPK
IL-18	EC	Induce IL-8	MAPK
IL-22	CD4+ Células T, DC, NK	Proliferación \uparrow , migración \uparrow , induce citoquinas pro-inflamatorias	Jak/Stat
IL-26	Th17 células T	Proliferación \downarrow , induce citoquinas pro-inflamatorias	Jak/Stat, Akt, MAPK
IL-31	IEL	Proliferación \downarrow , migración \uparrow ; induce IL-8	Jak/Stat, Akt, MAPK
IFN- γ	CD8+, Células T, NK	Proliferación \downarrow , apoptosis \uparrow , diferenciación \downarrow , función de barrera \downarrow , induce varias citoquinas diferentes, MHC clase II	Jak/Stat, Akt
INF- λ	DC	Proliferación \downarrow , induce IL-8	Jak/Stat
TNF- α	Mθ	Proliferación\downarrow, apoptosis\uparrow, función de barrera\downarrow, muestreo antígenos\uparrow	NF- κB, MAPK

Abreviaturas: **CD**: Células dendríticas; **EC**: Células epiteliales; **IEI**: linfocitos intra-epiteliales; **IFN**: Interferón; **Ig**: Inmunoglobulinas; **IL**: Interleuquinas; **Jak**: Janus quinasa; **MAPK**: protein quinasa mitogen-activada; **MHC**: complejo de mayor histocompatibilidad; **M θ** : Macrófagos; **NF- κ B**: factor nuclear κ B; **NK**: células asesinas naturales; **PI3K**: fosfatidinositol 3- quinasa; **Stat**: transductor de activación y activador de transcripción; **TNF**: factor de necrosis tumoral. **Citoquinas en color negro: las estudiadas.**

Inmunología y ecología intestinal

El tubo digestivo se encuentra libre de bacterias en el momento del nacimiento. Los animales criados en un ambiente libre de gérmenes no tienen microorganismos en la luz intestinal. Por lo tanto la flora entérica proviene exclusivamente del medio ambiente. Se sabe que las bacterias entéricas colonizan al recién nacido en dirección oral-anal [168]. En los humanos y en una amplia variedad de especies animales los coliformes y los estreptococos pueblan el tubo digestivo en pocas horas después del nacimiento. Veinticuatro horas más tarde, los lactobacilos anaerobios y enterococos se establecen y aumentan en número, mientras el número de coliformes disminuye entre los 10 y 21 días. Aproximadamente entre la tercera y la cuarta semana se establece las características de la flora bacteriana del individuo. La tabla 4 indica los tipos y cantidad de los microorganismos que normalmente colonizan los segmentos del tubo digestivo en una amplia variedad de especies animales, así como el pH en el lumen intestinal y el correspondiente potencial redox.

Tabla 4. Población de flora bacteriana en humanos.

	Estómago	Yeyuno	Ileon	Ciego
Total de bacterias	0-3	0-4	5-8	10-12
Aerobios y anaerobios facultativos	0-3	0-4	2-5	2-9
Anaerobios	0	0	3-7	9-12
Potencial redox (milivoltios)	+150	-50	-150	-200
Ph	3.0	6.0-7.0	7.5	6.8-7.3

Datos de las referencias [169-171]

*Log 10 de l número de organismos viables por gramo

El estómago y el intestino delgado normalmente contienen un número relativamente pequeño de bacterias. En cultivos yeyunales no se consigue identificar el crecimiento bacteriano en aproximadamente un tercio de voluntarios sanos. Si hay microorganismos presentes son los lactobacilos y los enterococos, aerobios gram-positivos, o anaerobios facultativos sobre los 10^4 organismos viables por gramo de contenido yeyunal. Los coliformes pueden estar transitoriamente presentes en el yeyuno de individuos sanos pero raramente superan los 10^3 organismos por gramo y probablemente representan los contaminantes ingeridos en su trayecto hacia el colon. Los organismos anaerobios bacteroides no se encuentran en el intestino delgado proximal de huéspedes sanos.

En el intestino delgado el pH se mantiene por encima de 7 y el potencial redox se vuelve fuertemente negativo. El ileon es una zona de transición entre la flora aerobia (estómago e intestino proximal) y la flora anaerobia (colon). Las concentraciones de microorganismos en el ileon aumentan a niveles de 10^5 - 10^9 por gramo de contenido.

Las enterobacterias, incluyendo los coliformes, se producen transitoriamente y en pequeñas cantidades en el intestino proximal, pero se encuentran en abundancia en el ileon. En el yeyuno normalmente no pueden sobrevivir los anaerobios estrictos (a diferencia del ileon).

Al cruzar la válvula ileocecal hay un cambio de características y cantidad de flora bacteriana. El número total aumenta hasta 10^9 - 10^{12} de microorganismos por gramo de contenido en el colon.

La flora microbiana que predomina a lo largo del intestino no son anaerobios estrictos como bacteroides, lactobacilos anaerobios y clostridios. Estos microorganismos son difíciles de cultivar y en la luz del colon superan a las bacterias aerobias facultativas en una proporción de 10000:1.

La flora del colon es muy compleja, encontrándose hasta 400 especies en un solo individuo [172]. Cuando se extirpa la válvula ileocecal, las bacterias de las porciones distales del ileon se asemejan a la población del ciego.

Los animales libres de gérmenes (axénico) presentan diferencias considerables en el tubo digestivo con respecto a los criados de forma convencional. Por ejemplo tienen las vellocidades de la mucosa intestinal más delgada, de aspecto más regular y las criptas menos profundas que las de forma convencional [171, 173, 174]. Cuando un animal axénico se contamina con tan sólo una bacteria, la mucosa intestinal cambia rápidamente, aparenta un estado de "inflamación fisiológica" observado en los animales criados convencionalmente. En los animales axénicos el tránsito intestinal es más lento y parece aumentar las peptidasas y disacaridasas en las microvellocidades. Este cambio puede implicar un aumento en la absorción de nutrientes [168]. Cuando se induce una disminución de la población bacteriana intestinal, los animales absorben más xilosa, aminoácidos y calcio de manera más eficaz.

Las enterobacterias hidrolizan el colesterol mediante el colesterol deshidrogenasa. La capacidad de metabolizar el colesterol y las sales biliares se incrementa en las enterobacterias de los pacientes que consumen una dieta rica en colesterol y los que padecen cáncer de colon [175, 176]

Los microorganismos intestinales hidrolizan los ácidos biliares conjugados secretados por el hígado a través de la 7-hidroxilasa, que elimina el grupo hidroxil de la posición 7 de los ácidos biliares. También convierten el cólico en desoxicólico y el ácido quenodesoxicólico a ácido litocólico. Durante este proceso se generan metabolitos tóxicos como el litocolato.

Las bacterias intestinales también alteran otros esteroides biológicamente activos tales como los andrógenos y los estrógenos. La β -glucuronidasa y la sulfatasa bacteriana hidrolizan las formas conjugadas de estas hormonas secretadas en la bilis para que se reabsorban a nivel intestinal y su consiguiente circulación enterohepática, reduciendo así sus niveles en plasma y orina [177].

Las enterobacterias metabolizan rápidamente los lípidos, las proteínas y los hidratos de carbono en el intestino (tabla 5). Hidrolizan a los glicéridos y sintetizan compuestos

lipídicos a partir de acetato. También sintetizan ácidos grasos ramificados e hidroxilados a partir de ácidos grasos procedentes de la dieta. Los ácidos grasos hidroxilados son los responsables de la diarrea en algunos pacientes acompañadas con una mala absorción de grasas. Además degradan las proteínas y la urea para producir amoniaco.

Las disacaridasas bacterianas propias del colon fermentan los azúcares no absorbibles procedentes de la dieta para formar ácido acético, el propiónico y el butírico. Estos productos son absorbibles a través de la mucosa intestinal del colon por difusión pasiva, de esta manera las bacterias cooperan disminuyendo el gasto energético.

Los ácidos grasos de cadena corta son importantes para mantener la integridad de la mucosa del colon. Los antibióticos inducen diarrea también pueden alterar procesos de fermentación que impiden que se formen ácidos grasos de cadena corta y dan lugar a un incremento de la osmolalidad intraluminal.

Tabla 5

SUBSTRATO	PRODUCTOS	IMPORTANCIA DEL HUESPED
Trigliceridos	Ácidos grasos y ácidos grasos hidroxilados	Diarrea
Proteínas	Amonio y aminas	Encefalopatía metabólica
Proteínas	Amonio y aminas	Encefalopatía metabólica
Carbohidratos	Ácidos orgánicos	Absorción colónica conserva calorías Diarrea osmótica
	Hidrógeno, CO ₂	Prueba del malaliento y malaabsorción
	Metano	Provocar una explosión durante la colonoscopia
	D-Lactato	Alteración de la función cerebral

12. Flora intestinal e infecciones

Se considera que el cuerpo humano contiene aproximadamente 10^{13} células y alberga de 10^{14} a 10^{15} microorganismos individuales. La flora normal del intestino contiene más de 400 especies de anaerobios en una concentración total de 10^{11} a 10^{12} unidades formadoras de colonia (ucf) por gramo de heces. La flora anaerobia sumando los bacilos Gram-negativos (BGN) y los cocos Gram-positivos (CGP) es inferior a 10^8 ucf/g de heces y la concentración media de hongos es inferior a 10^3 ufc/g. *Escherichia coli* es el BNG predominante y, entre CGP, el enterococo es el más prevalente. Aunque menos de 0,1% de la flora normal está constituida por aerobios, la mayoría de las infecciones esdógenas son causadas por esta flora aerobia.

La flora intestinal humana es muy dinámica y refleja los cambios inducidos por el ambiente, los tratamientos médicos y las características del huésped y del microorganismo. Los agentes antimicrobianos pueden modificar la flora microbiana del tracto digestivo cuando son absorbidos parcialmente tras la administración oral o cuando son excretados en la saliva, bilis, o moco. La actividad residual de muchos antimicrobianos es suficiente para interferir el balance ecológico de la flora intestinal. Esto puede resultar en una colonización por microorganismos exógenos potencialmente patógenos (MPP) en detrimento de la flora endógena previamente existente y en la aparición de la flora multirresistente secundaria al uso abusivo de antibióticos parenterales. Estos MPP son microorganismos aerobios y anaerobios que pueden ser parte de la flora normal de muchas personas sin causar signos clínicos de infección.

Existen muchos experimentos realizados en voluntarios sanos que demuestran los cambios de la flora intestinal tras la administración de antimicrobianos, así por ejemplo la administración de cefotaxima y clindamicina produce una elevación de las concentraciones fecales de enterococos y hongos. En diversos estudios se observó que cultivos de vigilancia realizados a los pacientes tras el ingreso en la UCI mostraban cambios en la flora a lo largo del tiempo. Si al ingreso la prevalencia de los Gram-negativos orofaríngeos era de 23%, a los 10 días ya era del 80%. En heces la prevalencia de los Gram-negativos diferentes de E-coli fue del 20%, y alcanzó el 79% en 15 días.

Posteriormente se observó que en el 76% de las infecciones desarrolladas se encontraba el mismo microorganismo previamente en los cultivos de vigilancia. Además de la gravedad de la enfermedad subyacente, la administración parenteral de antibióticos es el principal mecanismo que favorece al cambio de la flora del paciente por la flora nosocomial.

Si la resistencia contra la infección está disminuida (como en los pacientes con neutropenia), o si alcanzan un número elevado (por efecto de los antimicrobianos sobre otros microorganismos), pueden desarrollarse la infección. En este concepto llamado resistencia a la colonización está basada la DDS: la flora intestinal anaerobia tiene un efecto protector contra la colonización por BGN (aerobios). Si esta flora

anaerobia se elimina aumenta la colonización por BGN con el consiguiente riesgo de infección, especialmente en pacientes críticos. El objetivo de la DDS es eliminar esa flora de BNG y hongos del tracto digestivo sin influir en la flora anaerobia, así como impedir la aspiración de la flora multiirresistente.

13. Descontaminación digestiva selectiva

La infección en la unidad de cuidados intensivos (UCI) es debida a tres tipos diferentes de mecanismos debidos a una gamma limitada de microorganismos potencialmente patógenos (MMP) (seis “normales” y siete “anómalos”) y requiere diferentes maniobras profilácticas.

Las infecciones pueden ser (i) endógenas o exógenas, dependiendo de que el microorganismo causante sea portado por el paciente o no sea portado por el paciente (sino transmitida por un agente externo, por ejemplo, por el personal sanitario); (ii) primarias o secundarias, dependiendo de que el paciente sea portador de microorganismo causante en el momento del ingreso (primaria) o sea adquirido posteriormente (secundaria).

Las infecciones exógenas pueden controlarse sólo mediante medidas de higiene. Las infecciones endógenas primarias se controlan mediante la administración de antibióticos por vía parenteral. Las infecciones endógenas secundarias se controlan mediante la aplicación de fármacos antimicrobianos por vía entérica en la orofaringe y en el intestino (Tabla 1).

La DDS es una intervención terapéutica que consiste en la administración de un antibiótico por vía i.v. desde el momento del ingreso durante 3 días (con el fin de prevenir las infecciones endógenas primarias), y de antibióticos no absorbibles por vía enteral (con el fin de prevenir las infecciones endógenas secundarias).

Los antibióticos no absorbibles se administran en forma de una pasta de aplicación orofaríngea, y de un líquido de administración enteral (a través de la sonda nasogástrica).

La composición antibiótica está destinada a la eliminación de bacterias Gram-negativas potencialmente patógenas y de hongos (por ejemplo, polimixina, tobramicina y fluconazol o anfotericina). El objetivo del tratamiento es la prevención de infecciones (endógenas) y de la mortalidad asociada a esas infecciones.

Tabla 6. Control de infección nosocomial

Infección	MPP	Tiempo de administración	Frecuencia	Maniobra
Endógena primaria	6 «normales»	<1 semana	55%	Antimicrobianos parenterales
Endógena secundaria	9 «anómalos»	>1 semana	30%	Antimicrobianos enterales
Exógena	9anómalos»	Cualquier momento durante el tratamiento en la UCI	15%	Higiene
Control de profilaxis de eficacia/seguridad				Cultivos de vigilancia de orofaríngeo/recto

MPP: microorganismos potencialmente patógenos

Endóg. Prim.: infección endógena primaria

Endóg. Sec.: Infección endógena secundaria

Los 6 MMP “normales” son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Los 9 MMP “anómalos” son *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Acitenobacter*, especies de *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SARM)

Eficacia de la DDS

La hipótesis planteada más arriba sobre el papel de la flora intestinal en las infecciones desarrolladas en la UCI (infecciones endógenas secundarias) y el efecto potencial de la DDS sobre esas infecciones ha sido probada en numerosos estudios clínicos.

Existe 57 estudios aleatorizados controlados y diez meta análisis en los que se ha evaluado la eficacia de la DDS.

Se ha demostrado que la DDS reduce la tasa de neumonías y de bacteriemias en enfermos críticos en general.

Asimismo, un meta- análisis ha demostrado que la DDS reduce significativamente la colonización y la infección debidas a bacilos aerobios gram-Inegativos y levaduras, mientras que la reducción de la colonización debida a bacterias grampositivas no se significativa. Las infecciones por microorganismos Gram-positivos de las vías

respiratorias inferiores también se redujeron significativamente. El meta análisis más reciente sobre mortalidad, en el que se incluyó a 4755 pacientes de 22 RCT, demuestra que la DDS reduce la mortalidad de forma significativa.

Se ha planteado la objeción de que la administración de DDS puede, al exponer a las bacterias intestinales a una elevada concentración de antibióticos, aumentar la resistencia bacteriana de bacterias Gram-positivas intestinales. Los meta-análisis citados han demostrado que el tratamiento con DDS no aumenta el problema de resistencia antimicrobiana sino que, más bien, resuelve el problema de resistencia a antibióticos. En dos ensayos clínicos se evaluó el impacto del tratamiento con DDS sobre la resistencia antimicrobiana de BGN. El ensayo clínico más largo hasta la fecha incluyó a 1000 pacientes y demostró que la colonización por BGN resistentes a imipenem, ceftazidima, ciprofloxacina, tobramicina y polimixina tenía lugar en el 16% de los pacientes que recibieron fármacos antimicrobianos parenterales y enterales, en comparación con el 26% de los pacientes control que recibieron solo antibióticos por vía oral con un RR de 0,6 (IC del 95% 0,5-0,8). Esto coincide con un EAC previo que mostraba como la adición de antimicrobianos enterales a los parenterales controlaba la colonización y las infecciones debidas a *Klebsiella* productora de betalactamasa de espectro extendido (BLE).

Ali y cols evaluaron por más de dos años el resultado de la administración continuada de la DDS en pacientes intubados ≥ 72 horas. Se recogieron muestras microbiológicas, clínicas y de vigilancia. El 25% de los pacientes estudiados desarrolló colonización por uno o más organismos resistentes durante el tiempo de estudio, tardando un promedio de 10 días en producirse la colonización desde el ingreso. El microorganismo más frecuente colonizador fue la *Pseudomonas*, que representa la causa primaria de infecciones adquiridas en la UCI con el uso de la DDS, sin apreciarse el aumento de otros microorganismos.

La mayoría de los pacientes que necesitan tratamiento prolongado en la UCI presentan un sobrecrecimiento bacteriano intestinal, definido como la presencia de $>10^5$ MPP por ml de saliva o heces. El sobrecrecimiento en el intestino se asocia con un aumento de la mutación espontánea, lo que induce la policlonalidad y resistencia antimicrobiana. Los fármacos antimicrobianos parenterales, a diferencia de los enterales, generalmente no son capaces de erradicar el estado de colonización anómalo en condiciones de sobrecrecimiento, incluso de mutantes resistentes.

La DDS ha sido utilizada en dos UCI americanas con endemia de enterococo vancomicina resistente (EVR) [178, 179]. El estado del portador y el número de infecciones fueron bajos y similares en el grupo con DDS y el grupo control. El régimen clásico de DDS, sin vancomicina enteral, no está diseñado para el control de *Staphylococcus aureus* meticilín resistente (SAMR). Existe siete ensayos clínicos randomizados (ECR) en UCI con endemia para SAMR en el momento del ensayo clínico, que refiere una tendencia a un mayor número de infecciones por SAMR en los pacientes que recibieron la DDS [180, 181]. Para el control del SAMR en UCI con

endemia es preciso añadir vancomicina enteral a la DDS [182]. No ha habido emergencia de EVR en ninguno de los ECR que han usado vancomicina enteral, lo que promueve la aparición de EVR en el tracto gastrointestinal [183, 184]. La resistencia a antimicrobianos, una cuestión clave, ha sido evaluada en 8 estudios que monitorizaron la resistencia a antibióticos entre dos y siete años [185- 189], y la asociación entre la resistencia bacteriana y empleo de DDS no ha sido un problema clínico.

Los datos más recientes que muestran un beneficio de la DDS sobre la mortalidad, sin aparición de resistencia a antimicrobianos en pacientes de UCI no seleccionados, tienen un nivel de evidencia I (ECR con resultados certeros y baja posibilidad de falsos positivos o falsos negativos) y un grado de recomendación A (al menos dos ensayos clínicos con nivel de evidencia I). La tabla muestra las cinco maniobras médicas basadas en la evidencia que ofrecen un beneficio en la supervivencia en los pacientes de cuidados intensivos. Sólo la DDS es soportada por al menos dos investigaciones de nivel I [190, 191] son soportadas por sólo un ensayo clínico, por tanto, una recomendación grado B (un solo ensayo clínico con nivel de evidencia I). Además, hay que añadir que la DDS puede administrarse a cualquier paciente con riesgo de infección, mientras que las otras cuatro maniobras sólo pueden utilizarse en grupos específicos de pacientes de cuidados intensivos. Finalmente la DDS reduce la resistencia a antimicrobianos de los BGNA, mientras que la ventilación mecánica con volumen tidal bajo, la proteína C inactivada, el tratamiento intensivo con insulina y los corticoides no pueden tener ningún efecto sobre este importante problema.

Tabla 7. Control de la infección nosocomial

Intervención	Riesgo relativo (IC del 95%)	Red. Mort. Ab (%) (IC del 95%)	Nº necesario para tratar	Grado de recomendación
Volúmen corriente bajo	0,78(0,65 a 0,93)	8,8(2,4 a 15,3)	11	B
Proteína C activada	0,80(0,69 a 0,94)	6,1(1,9 a 10,4)	16	B
Insulina intensiva	0,44(0,36 a 0,81)	3,7(1,3 a 6,1)	27	B
Esteroides	0,90(0,74 a 1,09)	6,4(-4,8 a 17,6)	16	B
DDS	0,65(0,49 a 0,85)	8,1(3,1 a 13,0)	12	A

IC 95%: intervalo de confianza al 95%

14. Relación entre el daño del epitelio intestinal y el daño a nivel sistémico

Como hemos comentado anteriormente, el intestino es un reservorio de bacterias o endotoxinas que pueden desencadenar una infección y disfunción multiorgánica. Existe amplia evidencia de que las bacterias intestinales pueden escapar del intestino por el sistema portal y llegar a la circulación sistémica. Por tanto, el daño de la mucosa intestinal ocasiona una alteración a nivel sistémico.

La propuesta sobre los efectos del tratamiento con DDS para atenuar la respuesta inflamatoria tras un insulto se basa en parte en este concepto.

El intestino tiene una capa hidrofóbica adherida al epitelio intestinal [192, 193] que (i) limita el contacto de enzimas digestivas hidrofílicas y el epitelio de la velloidades; y (ii) actúa como barrera a la invasión bacteriana [194].

Diferentes estudios han demostrado el papel de la flora intestinal en el desarrollo de la respuesta inflamatoria tras diferentes insultos (shock, quemaduras), es decir, un efecto atenuador de la respuesta inflamatoria asociado el tratamiento con DDS.

Deitch cols [195] demostraron que en ratas sanas sometidas a un daño térmico se producía una translocación bacteriana por alteración de la mucosa gastrointestinal y desarrollo de cambios a nivel sistémico.

Yao y cols [196] demostraron (i) el papel del intestino en la patogénesis de la sepsis por translocación de endotoxinas; (ii) el papel de la DDS en la mortalidad de rata con quemaduras. En ratas quemadas que recibieron DDS la incidencia de translocación bacteriana a los ganglios linfáticos y viceversa fue menor así como los niveles de endotoxina en el tracto digestivo. La actividad diaminooxidasa intestinal, que se había visto elevada al inicio del insulto, volvía a niveles basales al quinto día en ratas descontaminadas pero no en los controles. Este cambio se asociaba a una mortalidad menor en las ratas tratadas con DDS. En un segundo estudio [197] estos autores demostraron que la translocación bacteriana intestinal estaba involucrada en una alteración de la respuesta celular inmune, como consecuencia de un daño térmico, y que el tratamiento con DDS podría atenuar esta inmunosupresión.

Las ratas quemadas presentaban una disminución en los niveles de células T, un aumento de la IL-2 y una alteración del cociente de las células T-helper (CD4+ y CD8+). La DDS evitaría la disminución de las células T, un aumento de la IL-2, sin afectar el cociente CD4+/CD8+.

En la misma línea Horton y cols. [198] observaron que el tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria en ratas quemadas. Los animales que sufrían una quemadura al 40% de la superficie corporal activaban una vía de señalización inflamatoria (PKC ϵ / P38 MAPK/NF- κ B), con la consiguiente liberación de citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IL-10), aumento de la expresión de PKC ϵ /P38 MAPK en el miocardio, translocación nuclear de NF- κ B, y finalmente disfunción miocárdica. El

tratamiento con DDS atenuó esta cascada de acontecimientos. Estos hallazgos condujeron a la hipótesis de que la quemadura sirve de desencadenante para que se produzca una pérdida de la función de la barrera gastrointestinal y la translocación de productos bacterianos, lo que finalmente lleva a la activación de la señal inflamatoria y la disfunción. En otro estudio, Horton y cols [199] puso de manifiesto que el tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria en ratas quemadas que sufrían sepsis y previene la bacteriemia (modelo de sepsis inducida mediante la administración de *S. pneumoniae* por vía intratraqueal).

Igualmente, Chen y cols [200] comprobó en ratas quemadas que la utilización de antibióticos de amplio espectro ocasionaba la desaparición de la flora comensal y una disminución de la expresión de TNF- α y TLR-4. Esto vendría a confirmar el papel de la flora comensal en el mantenimiento de la inmunidad innata en el intestino a través de la señal de TLR-4.

En el estudio de Deitch y cols [201, 202] se demostró en ratas que el shock hemorrágico seguido de la reinfusión de sangre promueve la translocación de bacterias desde el intestino a los órganos viscerales (ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo). Estas determinaciones se hicieron 24 horas después de que las ratas hallan sido sometidas a un shock hemorrágico durante 30 minutos (durante dicho tiempo las ratas se mantuvieron co 30 mmHg de presión arterial). El shock hemorrágico lesionó la mucosa intestinal y causó edema subepitelial y necrosis en algunas áreas. Las ratas tratadas con alopurinol, un inhibidor competitivo de la xantina oxidasa, redujo la incidencia de la translocación bacteriana. Del mismo modo hubo menor translocación bacteriana en las ratas alimentadas con suplemento de tungsteno y molibdeno, ambos inhibidores de la xantina oxidasa. El daño histológico causado por el shock hemorrágico fue impedido por el bloqueo de la actividad de la xantina oxidasa. Esto parece indicar que la translocación bacteriana desde el intestino parece estar mediada por los oxidantes generados por la activación del sistema de xantina oxidasa. Esto fue confirmado por Kahlke y cols [203] en ratas sometidas a shock hemorrágico la descontaminación digestiva selectiva reducía la translocación bacteriana. Sin embargo en las ratas sham el tratamiento con DDS se asoció con un aumento de citoquinas a nivel sistémico, concluyendo que el tratamiento con DDS puede tener un efecto beneficioso en el shock y nocivo en condiciones control (sin shock).

El papel de las bacterias intestinales en la respuesta inflamatoria ha sido también documentado en modelos de isquemia-reperfusión, en los que se ha demostrado la relación entre la pérdida de la integridad de la barrera epitelial de la mucosa con la aparición del SRIS y disfunción multiorgánica [204].

Los resultados de los estudios anteriormente expuestos han conducido al planteamiento de la llamada hipótesis intestinal del fracaso multiorgánico, que propone que la pérdida de la función de la barrera intestinal tras un insulto (e.g; shock, isquemia-reperfusión) se asocia con la entrada de bacterias y sus productos en la

circulación, originando síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, SDRA y disfunción multiorgánica.

15. Bacterias intestinales y enfermedad pulmonar

Existen estudios que ponen en manifiesto la relación del daño pulmonar secundario al daño a nivel intestinal.

Varios estudios [205, 206] evaluaron las posibles consecuencias sistémicas inducidas por el daño intestinal mediante la cuantificación de la actividad biológica de los ganglios mesentéricos ya que la activación biológica de los mismos conduce al daño pulmonar inducido por el intestino.

La N-acetilcisteína en un intestino sano induce un aumento de la permeabilidad intestinal, conlleva a la pérdida de la hidrofobicidad de la mucosa, un descenso en el grosor de la mucosa así como la evidencia morfológica de daño en las vellocidades [205]. Este daño se exagera más cuando se combina la acción de la N-acetilcisteína con las proteasas pancreáticas intestinales.

Sharpe y cols [205] diseñaron un estudio con cinco grupos de ratas: un grupo donde no hacen ninguna intervención y al resto de los grupos donde se les liga el segmento distal del ileon y se les rellena bien con suero salino, bien con proteasas pancreáticas, bien con N-acetilcisteína y por último otro grupo que se rellena el segmento del ileon con N-acetilcisteína y proteasas.

Pero el daño local del intestino por sí sólo no parece ser suficiente para inducir daño a distancia, ya que en este estudio no se ve que haya un aumento de la permeabilidad pulmonar ni una activación de los ganglios mesentéricos.

Hay pruebas que implican a TLR-4 en la patogénesis del DPA en un modelo murino de isquemia/reperfusión intestinal.

Ben y cols [206] estudiaron la relación entre el daño intestinal y la aparición de daño pulmonar e inflamación en ratones mutantes para TLR-4 (C3H/HeJ) y ratones *wild type* para TLR-4 (C3H/HeJ), sometidos a 40 minutos de isquemia intestinal mediante clampaje de la arteria mesentérica superior, y posterior reperfusión durante 6 horas.

Después de la isquemia-reperfusión intestinal, los pulmones de los ratones mutantes presentaban un daño histológico significativamente menor, una marcada reducción de la apoptosis epitelial, una menor activación de la caspasa, un incremento del cociente Bcl-xL/Bax, así como una gran disminución de la permeabilidad vascular pulmonar y de la actividad de las mieloperoxidasas en comparación con el grupo de ratones *wild type*.

Los ratones mutantes de TLR-4 tenían también una disminución importante de la expresión de TNF- α , IL-6, MCP-1, MIP-2. Asimismo la fosforilación de p38 MAPK y la activación de NF- κ -B y AP-1 se encontraban inhibidos en el tejido pulmonar de los ratones TLR4 mutantes.

Así, pues, TLR-4 y la vía de señalización de MAPK p38 y NF- κ B podrían estar involucradas en las vías de señalización que median la inflamación pulmonar tras la isquemia/ reperfusión intestinal.

Otros estudios en diferentes modelos añaden evidencia indirecta sobre la relación entre la inflamación a nivel pulmonar e intestinal. Por ejemplo se ha podido detectar un aumento de la concentración de LPS y TNF- α en el BAL de pacientes con el síndrome de neumonía idiopática (la mayor complicación del trasplante allogenico de médula ósea). Con el fin de investigar el eje intestino-pulmón en esta condición, se estudió un modelo animal de trasplante de médula. Los donantes provenían de cepas de ratones con diferente sensibilidad a LPS.

El receptor fue irradiado y recibió un trasplante de médula ósea de un donante LPS sensible o resistente; cinco semanas después del trasplante el grupo resistente a LPS mostró una disminución significativa del daño pulmonar comparado con el grupo sensible a LPS [207]. Este efecto se asociaba con una disminución de la secreción de TNF- α , tanto *in vitro* como *in vivo*, de los niveles de LPS en el BAL y del daño intestinal, de la concentración de LPS en BAL y de la disfunción pulmonar.

Por consiguiente la resistencia del donante a LPS disminuye el síndrome de neumonía idiopática en este modelo, al disminuir la translocación de LPS a través de la barrera intestinal y disminuir la producción pulmonar y sistémica de TNF- α .

16. Bacterias intestinales y VILI

La relación entre la presencia de bacterias intestinales y el desarrollo de una respuesta inflamatoria pulmonar ante ciertos estímulos (e.g; el biotrauma en el contexto de VILI) no ha sido estudiada en profundidad hasta el momento presente. Guery y cols [150] describió en un modelo de rata con VILI un aumento de la permeabilidad intestinal acompañado de un aumento de la concentración sérica de TNF- α mediante la administración de anticuerpos anti-TNF- α se acompañó de un menor aumento de la permeabilidad a nivel intestinal y pulmonar inducido por la ventilación mecánica.

III. Justificación, hipótesis y objetivos

1. Justificación del presente proyecto

El presente proyecto se plantea como objetivo la demostración de que el tratamiento con DDS se asocia con un efecto sobre la respuesta pulmonar a la ventilación mecánica. Indirectamente, se demuestra también el papel de las bacterias intestinales potencialmente patógenas sobre la respuesta inflamatoria del tejido intestinal y pulmonar, en condiciones basales y en condiciones de un estímulo inflamatorio (i.e., la ventilación mecánica utilizando V_T elevados).

Los antecedentes del proyecto hay que buscarlos en diferentes líneas de investigación de nuestro grupo, tanto en el área clínica como experimental.

En el área clínica, se practica desde hace unos años el tratamiento con descontaminación digestiva selectiva (DDS) en pacientes sometidos a ventilación mecánica. Se ha demostrado que la descontaminación de bacterias patógenas (gramnegativas) del tubo digestivo, respetando la flora endógena anaerobia y grampositiva, disminuye la incidencia de neumonías asociada al ventilador y mejora la supervivencia de pacientes críticos sometidos a ventilación mecánica. Análisis más recientes de nuestros datos indican que el tratamiento con DDS se asocia con una disminución de la disfunción pulmonar en pacientes críticos quemados, independientemente del efecto beneficioso sobre la incidencia de neumonía. Estos resultados sugieren un papel modulador de las bacterias intestinales sobre la magnitud de la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar. A la luz de estos hallazgos planteamos la posibilidad de abordar el estudio de este fenómeno en nuestro modelo animal.

En el modelo animal hemos reproducido en la rata los cambios fisiopatológicos e histológicos característicos del daño pulmonar agudo mediante la administración de ventilación mecánica utilizando V_T elevados. Este modelo reproduce no sólo las características clínicas del DPA sino también específicamente del daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica, conocido como VILI (*ventilator-induced lung injury*). El modelo experimental se caracteriza por el desarrollo tras un cierto tiempo de ventilación mecánica con V_T elevado de daño alveolar difuso (DAD) -el cambio histológico característico del DPA-, hipoxemia, empeoramiento de las propiedades mecánicas del pulmón, respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar, y cambios sistémicos como hipotensión y elevación de diferentes enzimas indicativos de citolisis inespecífica.

En este contexto planteamos la interesante hipótesis de que el tratamiento con DDS puede asociarse con un efecto sobre la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por la ventilación mecánica, es decir, que el tratamiento con DDS atenúa la inflamación pulmonar y la disfunción pulmonar en el contexto del VILI.

El interés de la hipótesis planteada, de claro carácter traslacional, descansa tanto en su interés científico como en su relevancia clínica. En efecto, la demostración del papel modulador de las bacterias sobre la respuesta inflamatoria pulmonar ante un estímulo (en este caso la ventilación mecánica) expande el conocimiento de *cross-talk* intestino-pulmón demostrado en otras condiciones.

Por otro lado, desde el punto de vista clínico, la demostración de la hipótesis planteada expande el abanico de efectos del tratamiento con DDS hacia efectos beneficiosos no meramente anti-infecciosos, sino también moduladores de la respuesta inflamatoria.

2. Hipótesis

El presente estudio constituye una investigación pionera sobre el efecto modulador del tratamiento con DDS sobre la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica.

Las hipótesis planteadas son:

- 1. Es posible descontaminar el tracto digestivo de bacterias Gram-negativas mediante la administración de un régimen de DDS.**
- 2. La ventilación mecánica con VT elevado induce una respuesta inflamatoria tanto en tejido pulmonar como en órganos diferentes del pulmón.**
- 3. El tratamiento con DDS modula la respuesta del sistema inmune innato a la ventilación mecánica con VT elevado.**
- 4. La presión de la vía aérea inicial define dos fenotipos con diferente respuesta a la ventilación mecánica y al tratamiento con DDS.**

3. Objetivos

- 1. Diseñar un protocolo eficaz de descontaminación digestiva selectiva en ratas.**
- 2. Demostrar que nuestro modelo de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica (VILI) reproduce las características propias de la condición clínica (cambios en la función y en la estructura pulmonar, cambios sistémicos y respuesta inflamatoria característicos del daño pulmonar agudo).**
- 3. Demuestra que el tratamiento con DDS modula la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica a la ventilación mecánica.**
- 4. Demostrar que las propiedades mecánicas basales del pulmón (presión en la vía aérea inicial) determinan la existencia de dos fenotipos caracterizados por una diferente respuesta a la ventilación mecánica y al tratamiento con DDS.**

IV. Capítulo 1: Comparación de Diferentes Protocolos de Descontaminación Digestiva Selectiva en Ratas

1. Resumen

Introducción

La descontaminación digestiva selectiva (DDS) es una estrategia preventiva utilizada en la práctica clínica para reducir la incidencia de la neumonía y de la mortalidad. Los estudios de DDS en ratas previamente descritos no han comparado la eficacia de diferentes regímenes de administración de DDS (dosis, vía de administración y duración del tratamiento) para conseguir el objetivo del tratamiento (la eliminación de microorganismos Gram negativos en muestras fecales). La dosis, vía de administración y duración de la DDS que permiten alcanzar el objetivo del tratamiento son desconocidos.

Objetivo

Diseñar un protocolo de DDS en ratas.

Material y métodos

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley (peso de 250-350g). Todas las ratas fueron guardadas individualmente en jaulas desinfectadas con clorhexidina 0,1%, con acceso *ad libitum* a bebida estéril y alimento esterilizado con óxido de etileno. Las jaulas y la viruta se renovaron diariamente para evitar la contaminación. Se comparó la eficacia de tres protocolos de DDS para descontaminar el tracto digestivo: *régimen A* (n=8): tobramicina (0,5mg/kg) y polimixina E (1mg/kg) adicionadas al agua de bebida durante 7 días; *régimen B* (n=9): tobramicina (12mg/kg) y polimixina E (30 mg/kg) administradas mediante una sonda orogástrica estéril cada 24 horas durante siete días; *régimen C* (n=9): tobramicina (6ml/kg) y polimixina E (15mg/kg) administradas mediante una sonda oragástrica estéril cada 12 horas durante cinco días. Se cultivó una muestra de heces diariamente (agar eosina y azul de metileno a 37°C durante 24 horas) durante 7 días. Todos los procedimientos siguen los principios del laboratorio animal (EU 86/609/CEE24-11, RD1201/2005 BOE 10-10, ley 32/2007 BOE 7-11).

Análisis estadístico: se comparó mediante el test de chi cuadrado la proporción de animales descontaminados tras 24 horas de tratamiento. Se define como descontaminación la ausencia de microorganismos Gram-negativos en el cultivo de la muestra fecal.

Resultados

Las muestras basales de heces (antes de la administración de DDS) contenían $4,0 \pm 1,5$ log UFC/g de microorganismos Gram-negativos. Tras 24 horas de tratamiento con DDS, 1/8, 9/9, 8/9 fueron descontaminadas (no mostraban crecimiento de Gram-negativos en las muestras fecales) con los protocolos A, B y C, respectivamente ($p < 0,001$).

Conclusiones

- (i) La administración de DDS mediante una sonda orogástrica estéril cada 24 horas es eficaz para descontaminar el tracto digestivo en ratas en tan sólo 24 horas de tratamiento; (ii) no es necesaria la administración de la DDS de

forma más frecuente (i.e; cada 12 horas); (iii) la administración oral *ad libitum*, tal como se ha utilizado en otros estudios, es ineficaz.

2. Introducción

La descontaminación digestiva selectiva (DDS) es una profilaxis antimicrobiana cuyo objetivo es la inhibición del crecimiento de la flora intestinal Gram-negativa y la preservación de la flora anaerobia. La preservación de las bacterias anaerobias parece especialmente importante para prevenir la colonización, sobrecrecimiento y posterior translocación de nuevas bacterias especialmente patógenas [208].

Existen diversas combinaciones de antibióticos no absorbibles que pueden ser empleadas como parte de la composición del régimen de DDS. Uno de los regímenes más usados en pacientes ventilados en la Unidad de Cuidados Intensivos [209] consiste en una combinación de polimixina E, tobramicina y anfotericina B (PTA) que se administra tanto en la cavidad oral (pasta de carboximetilcelulosa mezclado con 2% de PTA) tres veces al día como también a través de una sonda gástrica (suspensión de polimixina E 100mg, tobramicina 80 mg y anfotericina B 500mg) cuatro veces al día. PTA es el régimen adecuado para erradicar enterobacterias y pseudomonas.

La combinación de polimixina E y tobramicina presenta un perfil idóneo para su uso en la DDS , ya que son antibióticos que no se absorben en el intestino y son activos frente a la mayoría de las bacterias Gram-negativas, con una actividad inapreciable frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas y anaerobias, y muestran una mínima inactivación por parte de los alimentos y las enzimas fecales [210].

El sulfato de polimixina B es un polipéptido catiónico cíclico que tiene la propiedad de interactuar con la región del lípido A del lipopolisacarido (LPS) de las bacterias Gram-negativas. En varios experimentos *in vivo* se ha demostrado su eficacia para neutralizar la endotoxina [211, 212] pero su uso se encuentra limitado por la toxicidad renal cuando se administra a dosis elevadas. Su capacidad de fijación a endotoxina [197] y su mínima absorción hacen que la polimixina B sea una alternativa para limitar la cantidad de endotoxina en el tracto digestivo.

La tobramicina es un aminoglucosido que se caracteriza por ser catiónico y altamente polar, cualidad que determina una pobre absorción y una resistencia a la inactivación en el tracto gastrointestinal. En comparación con otros aminoglucosidos su unión a las heces (incluyendo sus componentes sólidos, moco, fibra y bacterias) es más reversible [213], propiedad por la que se encuentra libre en el lumen intestinal y no es eliminado fácilmente con las heces. Por eso su concentración y acción bactericida son mayores en comparación con otros aminoglucósidos [214, 215]

Los efectos de la DDS han sido estudiados minuciosamente en ratones para luego ser aplicados en la clínica. Stoutenbeek y cols [216] erradicaron exitosamente los

bacilos aerobios Gram negativos del tracto digestivo de ratones. El régimen PTA se ha empleado en varios modelos animales de quemadura [196, 197, 199, 217], peritonitis [218, 219], shock hemorrágico [203] con el fin de erradicar la flora bacteriana Gram negativa y disminuir la concentración de endotoxinas en el tracto digestivo.

En estudios clínicos se ha demostrado que la administración de DDS disminuye la incidencia de las infecciones nosocomiales, principalmente la neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVVM). En 1984 Stoutenbeek y cols [216] desarrollaron el concepto de la DDS para prevención de la infección en pacientes traumatizados y observaron una reducción en la incidencia acumulada de infecciones del 81% al 16%, así como una disminución de la incidencia acumulada de NAVVM del 59% al 8%, comparada con períodos consecutivos, antes y después de la DDS. También se ha demostrado que la DDS previene el desarrollo de la resistencia bacteriana [220].

3. Hipótesis

Es posible descontaminar el tracto digestivo de bacterias Gram-negativas mediante la administración de un régimen de DDS.

4. Objetivos

Objetivo general: diseñar un protocolo eficaz de DDS en ratas eficaz para disminuir la colonización del tracto digestivo por bacterias Gram-negativas.

Objetivo específico: encontrar cual de los tres regímenes diferentes de administración de DDS es más eficaz.

5. Material y Métodos

Animales y grupos experimentales

Se usaron ratas adultas macho *Sprague-Dawley* (peso 250-350g) convencionales, estirpes no consanguíneas, holoxigénicas, criadas en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe, aclimatadas a ciclo día/noche de 12 horas, alimentadas con pienso purina y agua *ad libitum* estéril.

El día en que comienza el experimento, cada animal es separado del resto de animales y estabulado de manera independiente en jaulas de metal que previamente fueron desinfectadas con clorhexidina 0,1% con acceso *ad libitum* a bebida con agua comercializada estéril y comida esterilizada con óxido de etileno.

La bebida, la comida, la jaula y la viruta se renovaron diariamente para evitar la contaminación. No se tomaron las medidas adecuadas para evitar la coprofagia.

La DDS se administró (el día 0) como agua de bebida *ad libitum* o mediante una sonda orogástrica estéril (según el grupo de randomización, *vide infra*)

Se considera día 0 el día en que se comenzó la administración de DDS.

Los cultivos obtenidos del día 0 se obtuvieron antes de iniciar el tratamiento con DDS. El tiempo de observación se prolongó hasta el día 7 de administración de DDS.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos que recibieron uno de tres regímenes de DDS caracterizados por la administración de DDS en el agua de bebida, o por sonda orogástrica en una o dos dosis diarias. Los regímenes consistían específicamente en:

Régimen A (n=8): tobramicina (0,5mg/ml) y polimixina E (1mg/ml) adicionados al agua de bebida durante 7 días.

Régimen B (n=9): tobramicina (12mg/ml) y polimixina E (30mg/ml). Se administró 1 ml mediante una sonda orogástrica estéril cada 24 horas por 7 días.

Régimen C (n=9): tobramicina (6mg/ml) y polimixina E (15mg/ml). Se administró 1ml mediante una sonda orogástrica estéril cada 12 horas durante 5 días.

El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario de Getafe. Se siguieron las normas de experimentación en animales (Directiva 2010/63/UE del parlamento Europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos), número de registro en la comunidad de Madrid EX030 UC y las guías locales de nuestro centro.

Cultivo microbiológico

Se practicó un hisopado rectal diariamente en condiciones estériles. Se sembró la muestra en una placa con agar eosina y azul de metileno para el aislamiento y diferenciación de las bacterias Gram negativas aerobias. Las muestras fueron inoculadas usando un método del cuarto cuadrante y se encubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se examinó la placa y se hizo una estimación semicuantitativa de colonias tomando como referencia la valoración aproximada según Leonard (Tabla 1).

Tabla 1. Valoración según Leonard

Valoración semicuantitativa (Índice de crecimiento bacteriano)	Ucf/ml
1+	1-10
2+	10-10 ³
3+	10 ³ -10 ⁵
4+	10 ⁵ -10 ⁷
5+	>10 ⁷

Método estadístico

Se realizó el test de la chi cuadrado para comparar la proporción de animales descontaminados.

Puesto que avanzado al tiempo de observación (día 1 a día 5) los tres regímenes resultan efectivos (100% de animales descontaminados con cualquier régimen al día 7), y puesto que el objetivo es determinar que régimen se asocia con descontaminación de los animales de forma más eficaz, a la luz de los resultados (*vide infra*) se comparó (y así se presenta en la Fig.2) la proporción de animales descontaminados en los 3 grupos al día 1. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

6. Resultados

Las muestras de heces basales (antes de la administración de DDS) contenían $4 \pm 1,5$ (valoración semicuantitativa), que equivale a 10^5 - 10^7 UCF/ml de microorganismos Gram negativos (Fig. 1).

El recuento de bacterias Gram negativas a lo largo del tiempo de observación tras la administración de los tres regímenes de DDS se indica abajo (Tablas 2, 3, y 4, Fig. 1 y 2).

Regimen A (n=8): todos los animales fueron descontaminados al día 2. Tres animales presentaron re-contaminación el día 3 (Tabla 2).

Regimen B (n=9): todos los animales fueron descontaminados al día 1 (Tabla 3)

Regimen C (n=9): seis animales fueron descontaminados al día 1 y 3 animales fueron descontaminados el día 2 (Tabla 4)

Tabla 2. Recuento de bacterias Gram negativas en las heces de las ratas que recibieron el Régimen A (*ad libitum*) durante 7 días

Ratas n=8	día de tratamiento							
	0	1	2	3	4	5	6	7
1	3+	2+	0	0	0	0	0	0
2	4+	3+	0	0	0	2+	0	0
3	3+	2+	0	2+	2+	2+	0	0
4	4+	2+	0	0	0	0	0	0
5	3+	3+	0	0	0	0	0	0
6	4+	3+	0	3+	2+	2+	2+	0
7	4+	1+	0	0	0	0	0	0
8	5+	2+	0	3+	2+	0	0	0

n+; índice de crecimiento bacteriano (la equivalencia ver cuadro 1)

Tabla 3. Recuento de las bacterias Gram-negativas en las heces de las ratas que recibieron el Régimen B (sonda orogástrica) durante 7 días.

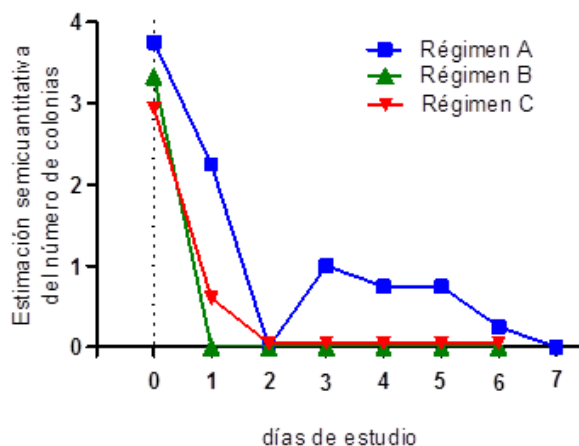
Ratas n=8	día de tratamiento							
	0	1	2	3	4	5	6	7
1	3+	0	0	0	0	0	0	0
2	4+	0	0	0	0	0	0	0
3	3+	0	0	0	0	0	0	0
4	4+	0	0	0	0	0	0	0
5	3+	0	0	0	0	0	0	0
6	3+	0	0	0	0	0	0	0
7	3+	0	0	0	0	0	0	0
8	3+	0	0	0	0	0	0	0
9	4+	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 4. Recuento de las bacterias Gram-negativas en las heces de las ratas que recibieron el Régimen C (sonda orogástrica, dos dosis diarias) durante 5 días.

Ratas n=9	día de tratamiento					
	0	1	2	3	4	5
1	2+	0	0	0	0	0
2	2+	0	0	0	0	0
3	4+	0	0	0	0	0
4	3+	0	0	0	0	0
5	2+	0	0	0	0	0
6	4+	1+	0	0	0	0
7	4+	1+	0	0	0	0
8	3+	3+	0	0	0	0
9	2+	0	0	0	0	0

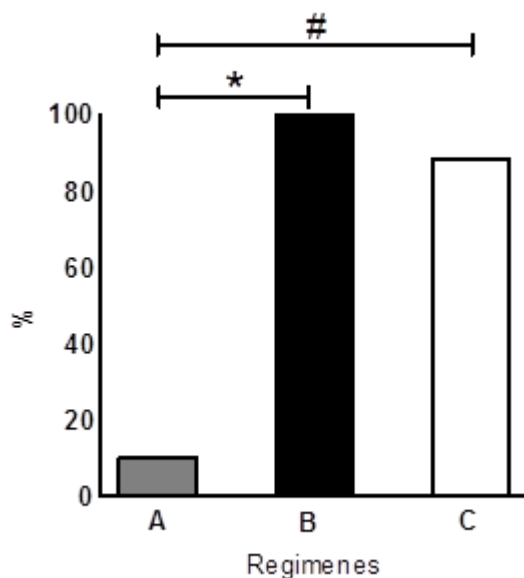
La proporción de animales que presentaron descontaminación a las 24 horas de tratamiento fue mayor con los regímenes B y C (Fig.2).

Figura 1. Recuento semicuantitativo de bacterias Gram negativas con cada uno de los regímenes de DDS



Abreviaturas: Estimación semicuantitativa del número de colonias (la equivalencia ver cuadro 1)

Figura 2. Porcentaje de ratas que presentaron descontaminación de bacterias Gram-negativas a las 24 horas del tratamiento



A: **Régimen A:** Tobramicina 0,5 mg/ml (*ad libitum*) n=8

B: **Régimen B:** Tobramicina 12 mg/ml, polimixina 30mg/ml (1ml al día) n=9

C: **Régimen C:** Tobramicina 6mg/ml, polimixina 15mg/ml (1ml cada 12 horas) n=9

Estadística: chi cuadrado.

*p<0.001 vs Régimen A

#p<0.003 vs Régimen A

En conclusión, nuestros resultados indican que:

- (i) La administración de DDS mediante una sonda orogástrica estéril cada 24 horas es eficaz para descontaminar el tracto digestivo en ratas en tan sólo 24 horas de tratamiento (Fig.1);
- (ii) No resulta necesaria la administración de la DDS de forma más frecuente (cada 12 horas);
- (iii) La administración oral *ad libitum*, tal como se ha utilizado en otros estudios, es ineficaz.

7. Discusión

Aún cuando existen estudios previos sobre el uso de DDS en modelos animales demostrando su eficacia para conseguir la eliminación de las bacterias Gram-negativas, ningún estudio previo ha comparado diferentes regímenes para demostrar cual es la vía de administración y la dosis más adecuada y fácil de administrar para conseguir el objetivo de tratamiento.

El objetivo del presente estudio es poner a punto un protocolo eficaz para conseguir descontaminación del tracto digestivo, reproduciendo los protocolos más utilizados en trabajos previos (régimen A y C), y comparándolos con el protocolo que diseñamos (régimen B).

Tras 24 horas de tratamiento con DDS, 1/8, 9/9, y 8/9 ratas fueron descontaminadas (no mostraban crecimiento de microorganismos Gram-negativos en las muestras fecales) de los protocolos A, B y C, respectivamente ($p < 0,001$) (Fig.2). La proporción de ratas con descontaminación alcanzó el 100% tras 7 días de tratamiento.

Régimen A

Nuestros resultados indican que con el protocolo A (administración de DDS *ad libitum*) todas las ratas se descontaminaron al séptimo día de tratamiento (Tabla 2).

Estudios previos [203, 219] utilizaron también este protocolo. Por ejemplo, Rosman y cols [219] demostraron que el tratamiento con DDS previene la translocación de bacterias Gram-negativas y de endotoxina en un modelo de peritonitis estéril. En este estudio, se administró zymosan (por vía i.p.) a ratas que durante siete días previos fueron tratadas con una solución de DDS (tobramicina 0,5 mg/ml y polimixina E 1mg/ml) por vía oral *Ad libitum*. Encontraron ausencia de bacterias Gram-negativas tras el tratamiento con DDS y una reducción en la concentración de endotoxina en las heces.

Kahlke y cols [203] demostraron que el tratamiento de la DDS influye modula la respuesta inmune intestinal en un modelo de shock hemorrágico. En este estudio, se indujo shock hemorrágico (succionando la sangre a través de la carótida durante 10 minutos hasta obtener una presión arterial de 30 mmHg, perfundiendo seguidamente la sangre extraída durante 15 minutos y observando la evolución durante 75 minutos más. En este estudio la DDS (tobramicina 0.5 mg/ml y polimixina B 1 mg/ml) se administró por vía oral *ad libitum* durante 7 días. El cultivo microbiológico de las heces del grupo control (ratas no tratadas con DDS) reveló una flora polimicrobiana (Tabla 5) compuesta por bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Proteus spp*) y Gram-positivas (*Streptococci*, *S. aureus* y *Enterococcus*), mientras que en las ratas tratadas con DDS los cultivos de heces revelaban ausencia de bacterias Gram-negativas y presencia de bacterias Gram-positivas (*Streptococci* y *Enterococcus*) (Tabla 5).

Nuestros resultados demostrando un 100% de animales descontaminados con DDS administrada *ad libitum* son acordes con los previamente descritos utilizando el mismo protocolo de administración y la misma duración de tratamiento (7 días) [203, 219]. Nuestros resultados añaden sin embargo, al conocimiento establecido que la administración durante sólo 1 día no es eficaz para descontaminar y que,

aunque el día 2 todos los animales se encuentran descontaminados, 3 de 8 sufren re-contaminación el día 3 , para resolver el estado de descontaminación posteriormente. Es, pues deseable, encontrar un protocolo de administración que sea eficaz en menos tiempo de duración del tratamiento.

En relación a lo descrito se concluye que el régimen de DDS (tobramicina 0.5 mg/ml y polimixina 1 mg/ml) administrado por vía oral *ad libitum* elimina las bacterias Gram-negativas de las heces de rata sin efecto sobre las bacterias Gram-positivas tras 7 días de tratamiento.

Tabla 5. Ratio de las bacterias en heces de las ratas siete días después de recibir *ad libitum* vehículo (control) o descontaminación digestiva selectiva del tracto digestivo (DDS) en el estudio de Kalke y cols [203]

	Vehículo (Agua)	DDS
<i>Proteus mirabilis</i>	6/6	0/6
<i>Escherichia coli</i>	6/6	0/6
<i>Streptococcus sp.</i>	4/6	6/6
<i>Staphylococcus sp.</i>	3/6	4/6
<i>Enterococcus</i>	2/6	4/6
Anaerobios	2/6	2/6

Las heces de todos los animales fueron recogidas y sembradas tanto en medios para bacterias aerobias como para las anaerobias. Los valores son el número de animales con cultivos positivos en relación con el número total de animales empleados [203]

Régimen B

Nuestros resultados indican que con el régimen B, administrando una sola dosis diaria de DDS por sonda orogástrica (tobramicina 12 mg y polimixina E 30 mg disueltas en 1 ml y administradas mediante una sonda orogástrica 24 horas durante 7 días) se consiguió erradicar bacterias Gram.negativas tras la primera dosis (al día 1). No se observó re-contaminación en ningún caso (Tabla 3).

Este protocolo de administración parece ser adecuado y cómodo para su utilización en modelos animales, ya que tras tan sólo una dosis de DDS se alcanza el objetivo deseado. En nuestro conocimiento ningún estudio previo ha utilizado este régimen de DDS.

Régimen C

Nuestros resultados indican que con el régimen C, administrando dos dosis diarias de DDS por sonda orogástrica (tobramicina 6mg/ml y polimixina E 15mg/ml

administradas por sonda orogástrica cada 12 horas durante 5 días) 6/9 ratas al día 1 y 9/9 al día 2 se descontaminan y se mantienen en este estado hasta el día 5 (Tabla 4).

El régimen C parece, pues, adecuado para conseguir el objetivo del tratamiento con DDS, aun cuando son necesarios 2 días de tratamiento.

Este régimen se basó en el empleado por Horton y cols en el año 2007 [199] para demostrar que la aplicación de la DDS en modelo con quemadura e insulto séptico atenúa la respuesta inflamatoria y previene la bacteriemia. En este estudio, se quemó el 40% de la superficie corporal de la rata administrando seguidamente la solución de DDS (polimixina E, 15mg; tobramicina, 6mg; flucitocina, 100mg) durante 5 días cada 12 horas. Al quinto día se administró por vía intratraquel *Klebsiella pneumoniae* y observando la evolución 24 horas más.

En otro estudio Horton y cols [198] en el año 2004 demostraron que la administración de DDS en un modelo de quemadura atenúa la respuesta inflamatoria y la disfunción del miocardio. En este estudio se indujo la lesión por quemadura del 40% de la superficie corporal de la rata que durante 3 días previos y 24 horas después de la lesión por quemadura fueron tratadas con una solución de DDS (polimixina E, 15mg; tobramicina, 6mg; flucitocina, 100mg disueltos en 3 ml de agua) administrada por vía oral a través de una sonda orogástrica cada 12 horas.

Sin embargo Horton y cols en ambos estudio mencionados no demostraron en sus estudios la erradicación de la flora bacteriana Gram-negativa (por ejemplo mediante cultivo de heces) sino que se basaron en los hallazgos encontrados por Yao y cols [196, 197]

Nuestros resultados son similares a otros estudios [196-199, 203, 221] utilizando un protocolo de administración semejante a nuestro régimen C.

Yao y cols. Demostraron que el pretratamiento con DDS atenúa la inmunosupresión causada por la lesión por quemadura, debido a una disminución de la translocación tanto de bacterias como de los componentes bacterianos. La DDS (tobramicina 6mg, polimixina E 15mg y flucitocina 100 mg disueltos en 3ml de agua) fue administrada por vía oral a través de una sonda orogástrica cada 12 horas durante 3 días antes y 5 días después de la lesión por quemadura. Para evaluar el efecto de la DDS [196, 197] se tomaron muestras de heces al tercer día (previamente a la inducción de la lesión por quemadura) para el cultivo microbiológico. Los resultados revelaron que las ratas tratadas con DDS fueron descontaminados de lbacilos entéricos Gram-negativos (tablas 6 y 7). No tomaron muestras de heces durante los dos primeros días del tratamiento con DDS, por lo que no se pudo determinar el momento en el cual la DDS resulta eficaz.

Tabla 6. Cuantificación de la flora fecal

	Tercer día de tratamiento con DDS por vía oral	
	Control	DDS
Bacilos entéricos	6.28±0.81	Neg.
Enterococos	6.46±1.83	6.90±0.96
Anaerobios totales	8.78±1.06	8.85±0.66

CFU: Unidades formadoras de colonias; **DDS:** Descontaminación digestiva selectiva; **Neg:** cultivo bacteriano negativo. Los valores son las medias ±SD log₁₀ CFU/g. Seis animales por grupo, (adaptado de [197]).

Tabla 7. Alteración de la flora fecal

	Tercer día de tratamiento con DDS por vía oral	
	Control	DDS
Enterobacterias	4.276±0.422	Neg.
Enterococos	4.832±1.389	4.338±0,898
Hongos	4.014±1.096	Neg.
Bacteroides	6.172±0.551	6.625±0.461
Lactobacilos	6.432±0.515	5.827±0.726

Adaptado de [196]

Nuestros resultados indican que con nuestro régimen B (tobramicina 12mg y polimixina E 30mg disueltas en 1 ml y administradas mediante una sonda orogástrica estérilcada 24 horas durante 7 días) las enterobacterias aerobias Gram-negativas fueron erradicadas tras 24 horas de recibir tratamiento y se mantiene así hasta el séptimo día.

Comparación de los diferentes regímenes

Los tres regímenes son comparables pues los animales se mantuvieron bajo las mismas condiciones durante el experimento. La coprofagia puede explicar en parte la re-colonización, más probable si se utiliza una dosis menor pero más frecuente (régimen C) que si se utiliza una dosis mayor aunque menos frecuente (régimen B), y la inconstante disminución de la CFU utilizando el régimen A.

El empleo de la sonda orogástrica como se hizo con los protocolos B y C confiere la seguridad de que las ratas reciben la dosis exacta de antibióticos.

Consiguientemente, hemos observado un efecto constante y reproducible, en consonancia con los estudios previos utilizando este régimen [196, 197].

La limitación principal del Régimen A es que el volumen preciso de la solución de DDS/agua ingerido al día es desconocido. Esto podría explicar la curva inconstante de descenso del número de CFU mientras duró el tratamiento (Fig.1). Además, el efecto del régimen A en comparación con el régimen B y C es más tardío e inconstante durante el período de tratamiento con la DDS. Según la literatura, se puede estimar que las ratas de un peso alrededor de 300g beben entre 10 y 12 ml de agua al día.

Nuestras observaciones así como los resultados previamente publicados [156, 172] demuestran que la DDS debe preservar la flora intestinal anaerobia, porque su pérdida se asocia con sobrecrecimiento intestinal de candida y de bacilos entéricos Gram-negativos.

Los estudios previos demuestran, en resúmen, que utilizando el régimen A (administración *ad libitum* de DDS) durante 7 días se consigue el objetivo del tratamiento [156, 172], de acuerdo con nuestros resultados.

Utilizando el régimen C, dos estudios han demostrado una adecuada descontaminación tras 3 días de tratamiento [196, 197], desconociéndose si el tratamiento es eficaz en puntos en el tiempo anteriores a los 5 días. Otro estudio utilizando el régimen C no documentó la erradicación adecuada de microorganismos [198, 199]. Nuestros resultados coinciden con los previamente publicados [196, 197], 153, 154] y añaden el conocimiento de que probablemente sea suficiente la duración del tratamiento de 2 días para conseguir el objetivo, no siendo necesaria la administración prolongada.

Finalmente, ningún estudio utilizó nuestro régimen B, que difiere del régimen c en la administración de una sola dosis diaria y una mayor dosis por administración. Este régimen parece, en nuestra experiencia, el más conveniente, pues consigue el objetivo en tan sólo 1 día (es decir, tras la administración de una sola dosis de DDS).

Por tanto, nuestros resultados nos permiten concluir que el régimen B presenta, con respecto a otras formas de administración (regímenes A y C), las siguientes ventajas:

- i) la administración de una dosis exacta, en comparación con el protocolo A, cuya administración es *ad libitum*;
- ii) una dosis menos frecuente (cada 24 h), a diferencia del régimen C (cada 12 h);
- iii) una duración de tratamiento breve, quizá de tan sólo 1 día.

V. Capítulo 2: Efecto de la Descontaminación Digestiva Selectiva sobre los Cambios Inducidos por la Ventilación Mecánica

1. Resumen

Introducción

La ventilación mecánica con V_T elevado se asocia con inflamación e hiperpermeabilidad pulmonares (*ventilator induced lung injury, VILI*). Estudios previos han demostrado la asociación del daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica con daño sistémico (en órganos diferente del pulmón), debido a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias a nivel sistémico (e.g., disfunción vascular, inflamación renal, hiperpermeabilidad intestinal [150, 222-225])

Se desconoce el papel de las bacterias intestinales en la respuesta pulmonar y sistémica a la ventilación mecánica.

En el presente estudio planteamos la hipótesis de que la microflora intestinal modula la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica inducida por la ventilación mecánica.

Objetivo

Demostrar el efecto modulador de la DDS sobre la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica inducida por la ventilación mecánica.

Material y métodos

Ratas macho *Sprague-Dawley*, peso 300-350 gr, recibieron DDS (polimixina y tobramicina en agua) o placebo (vehículo) 24 horas antes de recibir ventilación mecánica durante 2,5 horas con una de dos estrategias:

- (i) $V_T = 9 \text{ ml/kg} + \text{PEEP} = 5 \text{ cmH}_2\text{O}$ (V_T Bajo, CONTROL);
- (ii) $V_T = 25 \text{ ml/kg} + \text{PEEP} = 0 \text{ cmH}_2\text{O}$ (V_T Alto, VILI).

Se estudiaron cuatro grupos de animales, según fueran tratados con DDS o con vehículo. : V_T bajo-vehículo, V_T bajo-DDS, V_T alto-vehículo y V_T alto-DDS.

Durante el período de ventilación mecánica se monitorizó la presión arterial y la presión en la vía aérea. Al final del período de ventilación, los animales fueron sacrificados mediante exanguinación, y se obtuvieron muestras de sangre arterial para la determinación de gasometría, de suero y de tejido pulmonar e intestinal.

En suero se realizaron determinaciones bioquímicas y de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1, IL-1 β (ELISA) y endotoxina (test de lisado del amebocito *Limulus Polyphemus*).

En tejido pulmonar e intestinal se determinó la concentración tisular de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1, (ELISA) y la expresión de los genes TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1, CXCR2, CCR2 (RT-PCR). En tejido pulmonar se midió además la concentración de IL-1 β (ELISA) y de TLR-4 (Western blot).

También se extrajo lavado broncoalveolar (LBA) para la cuantificación de IgM y proteínas totales.

El pulmón izquierdo se fijó para posterior estudio histológico (Hematoxilina eosina y TUNEL). La determinación de proteínas y de la expresión de genes se realizó en el pulmón derecho

Todos los procedimientos siguieron los principios de cuidado de animal de laboratorio (EU 86/609/CEE24-11, RD 1201/2005 BOE 10-10, ley 32/2007 BOE 7-11).

Se compararon los grupos mediante ANOVA factorial analizando los efectos de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS.

Resultados

Efectos de la ventilación mecánica

Las ratas que recibieron V_T elevado mostraron hipotensión, disminución de la distensibilidad pulmonar e hipoxemia, así como un aumento de la concentración de proteínas e IgM en el LBA.

En el tejido pulmonar, aumentó la concentración tisular de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1 y de la expresión de sus genes correspondientes. La expresión génica de CXCR2 disminuyó en animales que recibieron V_T elevado. Asimismo, la concentración de TLR-4 disminuyó. También se observaron alteraciones histológicas consistentes con la presencia de daño pulmonar agudo (presencia de membranas hialinas) y de aumento de la apoptosis (TUNEL).

En el suero, la ventilación mecánica con V_T elevado aumentó la concentración de MIP-2, en comparación con V_T Bajo.

En el tejido intestinal, la ventilación mecánica con V_T elevado, en comparación con V_T bajo, se asoció con una menor concentración de MIP-2 y una menor expresión del gen MIP-2.

Efecto del tratamiento con DDS

El tratamiento con DDS en los animales que recibieron ventilación mecánica con V_T bajo no se asoció a ningún cambio de la presión arterial, distensibilidad pulmonar, intercambio gaseoso, concentración de IgM o proteínas en LBA.

En tejido pulmonar, se observó una tendencia (no significativa) a una mayor concentración de TNF- α , MIP-2 y MCP-1, en comparación con el grupo no tratado con DDS, y a una menor expresión génica (no significativa) de MIP-2 y MCP-1.

En el suero, el tratamiento con DDS se asoció con una disminución de la concentración de TNF- α , IL-6 en comparación con el grupo no tratado.

En el tejido intestinal, los animales tratados con DDS mostraron una mayor concentración de IL-6, una menor concentración de MIP-2, y una menor expresión de los genes IL-6, MIP-2 y CXCR2.

Efectos del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

Los animales que recibieron ventilación mecánica con V_T elevado, el tratamiento con DDS se asoció, en comparación con los animales que no recibieron DDS, con una atenuación en el aumento de la permeabilidad alveolocapilar y una atenuación de la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar (menor elevación de la concentración tisular de TNF- α , IL-6 y MCP-1).

En el suero, los efectos de la ventilación mecánica no se modificaron por el tratamiento con DDS. En el tejido intestinal, el tratamiento con DDS no modificó la respuesta a la VM con V_T elevado.

Conclusiones

El tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica asociada a la VM utilizando volúmenes tidal elevados. Nuestros resultados demuestran que la flora intestinal modula la respuesta pulmonar a un estímulo inflamatorio.

2. Hipótesis

El presente estudio constituye una investigación pionera sobre el efecto modulador de las bacterias intestinales sobre la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica.

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

1. La ventilación mecánica con VT elevado induce una respuesta inflamatoria tanto en tejido pulmonar como en órganos diferentes del pulmón.
2. El tratamiento con DDS modula la respuesta del sistema inmune innato a la ventilación mecánica con VT elevado.

3. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Demostrar el efecto de la ventilación mecánica con VT elevado sobre:
 - La función cardiovascular
 - La mecánica respiratoria
 - La función pulmonar
 - La afectación de otros órganos
 - La respuesta inflamatoria y apoptótica en tejido pulmonar
 - La respuesta inflamatoria sistémica
 - La respuesta inflamatoria intestinal

2. Demostrar el efecto del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica sobre:

- La función cardiovascular
- La mecánica respiratoria
- La función pulmonar
- La afectación de otros órganos
- La respuesta inflamatoria y apoptótica en tejido pulmonar
- La respuesta inflamatoria sistémica
- La respuesta inflamatoria intestinal

4. Material y Métodos

Animales y grupos de estudio

Se utilizaron ratas, *Sprague-Dawley* adultas, estirpes no consanguíneas y holoxigénicas, peso 300 g-350 g, criadas en el animalario del Hospital Universitario de Getafe, aclimatadas a ciclo día/noche de 12 horas, alimentadas con pienso purina y agua *ad libitum*. Cada animal fue separado del resto de los animales 24 horas antes de ser sometido a ventilación mecánica, estabulado de manera independiente, y acondicionado a un ambiente, alimento y bebida estériles. Los animales fueron aleatorizados en dos grupos (n=40 por grupo) para recibir tratamiento con descontaminación digestiva selectiva (DDS) (1 ml de solución compuesta por tobramicina 12 mg; polimixina E 30 mg) o vehículo (VEH) (1 ml de agua estéril) a través de una sonda orogástrica insertada al efecto. Se administró una dosis de DDS 24 horas antes del período de la ventilación mecánica. La técnica de aleatorización (para la asignación al grupo DDS o vehículo) fue mediante un sistema de sobres cerrados.

Técnica quirúrgica, grupos de estudio y monitorización

Transcurridas 24 horas de la aleatorización y administración del tratamiento (DDS o VEH), los animales fueron premedicados con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y diazepam (5 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.). Una vez conseguido el plano anestésico adecuado se obtuvo una muestra de exudado rectal mediante un hisopado (con el objeto de demostrar la eficacia del tratamiento con DDS administrado el día anterior).

A continuación, se canalizó la vena femoral para el mantenimiento anestésico con perfusión continua de ketamina (50 mg/kg) y midazolam (8 mg/kg) a un ritmo de 10 ml/kg/h (bomba de jeringa modelo Aladdin-1000, World Precision Instruments, UK). Según la necesidad individual de cada animal, se administraron bolos suplementarios para mantener la sedación y adaptación a la ventilación mecánica.

A continuación se procedió a pesar y rasurar la parte ventral del cuello y de la pata, y el animal fue posicionado en decúbito supino sobre una placa térmica (Challoner Marketing Limited, UK). Se aplicó povidona yodada sobre la cara anterior del cuello, tórax y abdomen, y raíz de los miembros inferiores. Se canalizó la vena femoral derecha mediante un angiocatéter Abbocath 24G, que fue fijado con pegamento quirúrgico y utilizado para comenzar de forma inmediata la administración de la sedo-analgésia descrita.

Posteriormente, se practicó una incisión vertical de la parte ventral del cuello, se localizó, aisló y canalizó la traquea con angiocatéter Abbocath 14G, el cual fue conectado al ventilador (Babylog 8000 Plus Dräger, Lübeck, Alemania) a través de un adaptador. Seguidamente, se canalizó la carótida izquierda con Abbocath 22G con fijación proximal, que fue conectado a un monitor de presión arterial (Hewlett Packard, Model 66S, Ginebra, Suiza) a través de una llave de tres pasos para el registro continuo de presión arterial y extracción de muestras de sangre arterial.

Tras el período de monitorización (canalización vascular, traqueostomía, conexión a la ventilación mecánica), los animales fueron ventilados durante un periodo de estabilización de 30 minutos utilizando los parámetros ventilatorios del grupo control (V_T bajo) antes del inicio del período de ventilación mecánica de 2,5 h de duración utilizando la estrategia asignada según el proceso de aleatorización.

Por tanto, los cuatro grupos experimentales fueron:

V_T Bajo-VEH

V_T Alto-VEH

V_T Bajo-DDS

V_T Alto-DDS

Los animales de ambos grupos (DDS o VEH) fueron aleatorizados de nuevo a $t = -5$ min (justo antes del comienzo del período de ventilación mecánica de 2,5 h de duración) mediante un sistema de sobres cerrados, para recibir en $t = 0$ min (24 h tras la administración de DDS o VEH) ventilación mecánica con V_T Bajo ($V_T = 9$ ml/kg + PEEP = 5 cmH₂O, CONTROL) o ventilación mecánica con V_T elevado ($V_T = 25$ ml/kg + PEEP = 0 cmH₂O, VILI).

A $t = -5$ min se obtuvo una muestra de sangre arterial para la medición de gases arteriales (5 min antes del comienzo del período de ventilación mecánica de 2,5 h de duración, ver más abajo).

A $t = 0$ min se inició el período de 2,5 h de ventilación mecánica de acuerdo con el grupo asignado por aleatorización (V_T Bajo o V_T Alto).

Tras 2,5 horas de ventilación mecánica, a $t=150$ minutos los animales fueron sacrificados mediante exanguinación a través de la arteria carótida. La sangre arterial extraída fue utilizada para medición de gases arteriales y obtención de suero para congelación a -80° y posteriores determinaciones bioquímicas (ver más abajo). A continuación, se realizó un lavado broncoalveolar (LBA). Finalmente, se practicó una

esternotomía para aislar el bloque cardiopulmonar y una laparotomía para la extracción de un segmento intestinal (ver más abajo).

Cultivo microbiológico de los hisopados rectales

La toma de muestras de heces se hizo inmediatamente antes y 24 horas después de administrar la DDS (justo antes del inicio del período de ventilación mecánica de 2,5 h de duración). Se introdujo un hisopo en el recto de la rata en condiciones higiénicas e inmediatamente se llevó la muestra al laboratorio de microbiología del Hospital Universitario de Getafe. Para el aislamiento y diferenciación de los bacilos Gram-negativos, la muestra fue sembrada en una placa de agar eosina-azul de metileno y se incubó durante 48 horas a 37°C. Finalizado el proceso, se hizo un recuento semicuantitativo de colonias según la valoración de Leonard (ver Material y Métodos del capítulo 1, pág.33)

Mediciones

Parámetros hemodinámicos

En los cuatro grupos de animales se realizaron las determinaciones que se detallan a continuación. Se recogieron las diferentes variables a $t = -5$ min y transcurridos los 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos tras el inicio del período de ventilación mecánica de 2,5 h de duración. Se registraron la frecuencia cardíaca (FC) y la presión arterial sistémica media (PAM) en un equipo para monitorización cardiovascular 71034 Hewlett packard (model 66s, Ginebra, Suiza). La FC se midió en latidos por minuto (lpm), y la PAM en mm Hg.

Parámetros gasométricos y ventilatorios

Se registró la presión pico en la vía aérea (*peak inspiratory pressure* [PIP], el volumen corriente (V_T) y el volumen minuto (VM) a $t = -5, 0, 15, 30, 60, 90, 120$ y 150 minutos, medidos por los traductores del respirador, así como la distensibilidad (*compliance*) dinámica (C_{DYN}) y la resistencia de la vía aérea (R_{VA}), calculadas por el respirador.

Se midieron el pH, el bicarbonato arterial y las presiones parciales de O_2 y CO_2 , y la saturación de O_2 en muestras de sangre arterial obtenidas a $t = -5$ min y $t = 150$ min, utilizando un analizador de gases en sangre (Gem Premier 3000 pH/Blood Gas Analyzer, Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain).

El bicarbonato se midió en mEq/L, PaO_2 y $PaCO_2$ se midieron en mmHg, $SatO_2$ se midió en %, PIP en cm H_2O , VM en L/min, C_{DYN} en ml/cm H_2O y R_{VA} en cm H_2O /L/s.

Procesamiento de los fluidos y tejidos extraídos

Lavado bronco alveolar

Tras abrir la caja torácica por la línea media ambos pulmones se lavaron a través del catéter 14G conectado a la traquea con 10 ml de suero salino a 4°C. Se recogieron aproximadamente 8 ml de lavado broncoalveolar (LBA), que fueron inmediatamente

centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos a 4° C. El LBA libre de células se utilizó para la determinación de proteínas y de IgM.

Suero fresco

Parte de la sangre recogida en el momento final del experimento fue recogida en tubos con EDTA para la determinación inmediata de parámetros bioquímicos (concentración de lactato, glucosa, urea, creatinina, sodio; y actividad enzimática de alanino aminotrasferasa [GOT], aspartato aminotransferasa [GPT], lactato deshidrogenasa [LDH], y creatina kinasa [CK]).

Suero congelado

Al final del experimento se extrajo a través de la carótida la máxima cantidad de sangre posible (7-10 ml). Una parte de esta se recogió en un tubo con gelatina (vacutest kima srl 3,5 ml ARZERGRADE-ITALY) y se guardó en frío mientras se continuaba con el proceso de recogida de muestras. Seguidamente fue centrifugado a 3500 rpm a 4°C durante 10 minutos (Biofuge 22R Heraeus instruments Germany). El suero fue recogido y alicuotado en tres criotubos (400 µL en cada criotubo, aproximadamente) y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido a -80°C. Una hora después, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta la cuantificación de proteínas totales, citoquinas y quimioquinas.

Plasma

La colección del plasma se llevó a cabo con material apirógeno. Se separó una pequeña cantidad de la sangre total extraída al final del experimento (unos 2 ml), que fueron alicuotados en tubos de 3 ml que contienen heparina sódica (15-30 UI/ml). Las alícuotas fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm, con el fin de obtener plasma, que fue inmediatamente congelado a -80°C hasta su procesamiento y determinación de LPS.

Tejido pulmonar

Después de practicar el LBA, el lóbulo inferior del pulmón derecho se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Una hora después las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de realizar las diferentes determinaciones (cuantificación de proteínas y expresión génica).

Intestino

Se seccionó un segmento de ileon distal (2 cm a partir de 1 cm después de la válvula ileocecal), que fue lavado cuidadosamente con suero salino frío y congelado en nitrógeno líquido. Una hora después se guardó a -80°C hasta el momento de realizar las diferentes determinaciones (cuantificación de proteínas y expresión génica).

Cuantificación de LPS en plasma

La presencia de LPS plasma se evaluó con el test de lisado de amebocitos de *Limulus Polyphemus* (LAL). Para hacer una estimación límite o semicuantitativa usamos el método colorimétrico de punto final. Este método se fundamenta en el empleo de un

sustrato cromogénico sintético incoloro. El sustrato está compuesto por un pequeño péptido unido por la arginina C-terminal a una molécula de cromóforo p-nitroanilina (pNA). Una vez activada la cascada del LAL, la enzima coaguladora provoca la liberación de la molécula de pNA de color amarillo. El desarrollo del color amarillo es proporcional a la concentración de endotoxina en la muestra. La reacción se detiene al adicionar ácido acético, pudiéndose medir su absorbancia a 405 nm. El método cromogénico permite estimaciones cuantitativas. La concentración de endotoxina puede determinarse a partir de una curva patrón.

Para su análisis, las muestras de plasma se descongelaron, se centrifugaron durante 20 minutos y se diluyeron a la mitad con agua libre de endotoxina. Seguidamente se calentaron las muestras a 75°C y se la temperatura 5 minutos para eliminar el efecto inhibitor del plasma en la reacción de LAL. Después de enfriarse a temperatura ambiente (20-25°C) se cuantificó la endotoxina siguiendo las recomendaciones y las instrucciones del Kit de Elisa (Hycult biotech, HIT302). Para su correcta valoración se preparó una curva patrón (0-10EU/ml) según las instrucciones del fabricante.

Protocolo

Antes de comenzar el ensayo todos los reactivos se acondicionaron a temperatura ambiente (20-25°C)

En una placa de poliestireno de 96 pocillos se preparó una curva patrón de LPS con un rango de (0-10EU/ml) según las instrucciones del fabricante. En paralelo se distribuyó por duplicado 50µl de las muestras de plasma en los pocillos asignados para estos, seguidamente se añadió 50µl de LAL (sustrato reconstituido con 4ml de ALE), y se dejó encubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Transcurrido el tiempo de reacción se leyeron las placas en un espectrofotómetro a 405 nm.

Extracción de proteínas totales de los tejidos

El lóbulo inferior derecho del pulmón congelado se homogeneizó por el método de perlas de cerámica, basado en la ruptura y molienda del tejido ocasionadas por la agitación de las perlas de cerámica, a un ritmo de tres veces cada 30 segundos, con períodos de descanso de tres minutos, a 4°C con el fin de evitar la desnaturalización de proteínas.

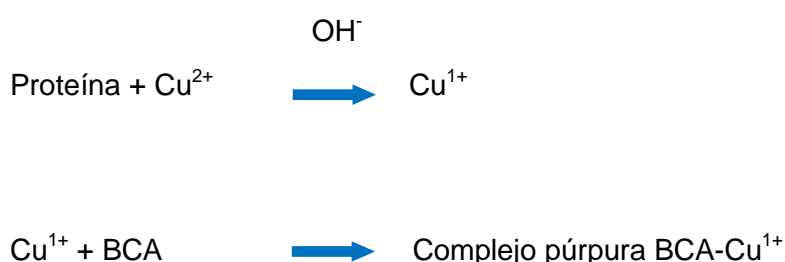
Para este proceso de homogeneización se utilizó el MagNA lyser (MagNA lyser Green Beats -Roche). Antes de homogeneizar el tejido en el MagNALyser se adicionó un tampón de lisis que consiste en una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets 1X -Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) y un detergente compuesto por 25 mM de bicina y cloruro de Sodio 150 mM T-PER (*Tissue Protein Extraction Reagent*, Thermo Fisher Scientific E.U). El homogenado se guardó por 30 min a 4°C, se recolectó la fracción del sobrenadante y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C para su posterior uso en Western blots y ELISAs.

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA) es un método altamente sensible [226].

Principio

BCA, en la forma de su sal de sodio soluble en el agua, es un reactivo altamente sensible y específico para el ión Cu^{1+} . Se ha demostrado que la cisteína, cistina, triptófano, tirosina y el enlace peptídico son capaces de reducir el Cu^{2+} a Cu^{1+} (Wiechelman 1988). La cuantificación por BCA se combina con la Reacción de Biuret (Reacción de la proteína con Cu^{2+} en un medio alcalino para producir Cu^{1+}). El producto de la reacción presenta un color púrpura, formado por la interacción de dos moléculas de BCA con el ión Cu^{1+} , es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. Esto permite la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa.



El contenido en proteínas totales se determinó en el LBA, en el suero y en el tejido pulmonar a partir de una reacción colorimétrica con BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo scientific, Rockford USA), empleando el ensayo de diagnóstico comercial de Pierce.

Se utilizó una curva patrón de albúmina de suero bobino (BSA) con concentraciones de 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras se analizaron sin diluir. Tras añadir el reactivo de BCA, se incubaron las muestras y el estándar durante 30 minutos a 37°C , y se midió la absorbancia entre 540-590 nm en un espectrofotómetro (F 129024- TECAN Genious plus, Australia). La cuantificación de la concentración de proteínas de las muestras se realizó mediante regresión lineal e interpolación de las absorbancias (540-590 nm) de las muestras de la curva patrón.

Cuantificación de la IgM en el lavado bronco alveolar

La Inmunoglobulina M (IgM) es la más grande de los cinco isotipos de inmunoglobulina (G, A, M, E, D) presente en mamíferos, constituyendo el 6% de la población presente en sangre.

Uno de los métodos para determinar el grado de compromiso de la membrana alveolocapilar consiste en el análisis del líquido obtenido del LBA. En condiciones de alteración de la permeabilidad de la membrana alveolocapilar, aumenta el paso de

moléculas grandes desde el espacio intravascular al espacio intraalveolar por difusión pasiva.

Para la cuantificación de IgM en el LBA se usó el kit de ELISA para IgM (Rat IgM quantification ELISA kit, Immunology Consultants Laboratory ICL U.S.A). Para la correcta valoración se preparó una curva patrón con un estándar comercial de IgM (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 ng/ml).

Principio

Se emplearon 12 placas de 8 pocillos. En este ensayo todos los pocillos de la placa estaban impregnados con anticuerpos anti-IgM de rata.

Se basa en el principio del ELISA sandwich doble anticuerpo. En este ensayo, la IgM presente en las muestras reaccionan con los anticuerpo anti-IgM que están adheridas a la superficie de los pocillos de la placas de poliestireno. Seguidamente se eliminan de la placa las proteínas que no se unieron mediante lavados, para luego adicionar los anticuerpos conjugados con la peroxidasa horseradish (HRP- *Horseradish peroxidase*). Estos anticuerpos marcados con el enzima forman complejos con la IgM que previamente se unieron a los anticuerpos anti-IgM adheridos a la placa. Seguidamente se procedió a realizar lavados para luego adicionar el susbtrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencinina (TMB). Este sustrato interaccionará con el complejo Anti-IgM-HRP*IgM*Anti-IgM. La cantidad de la unión enzimática dependerá de la concentración de IgM de la muestra analizada. Se midió la absorbancia de las muestras analizadas a 450 nm para evaluar la concentración de IgM en las muestras. Los valores de absorbancia obtenidos de las muestras se interpolaron con la curva estándar construída con los estándares, proporcionando una medida relativa de la concentración de IgM. Además se corrigieron por el factor de dilución.

En resumen, La determinación de Ig M en el LBA se hizo por duplicado, utilizando 100 µl de muestra. La IgM presente en el LBA se une a los anticuerpos anti-IgM absorbidos a la superficie de los pocillos de la microplaca. A continuación, se incuba con anticuerpos anti-IgM conjugados con peroxidasa. Finalmente se añade el sustrato cromogénico 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H₂O. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido sulfúrico y la formación de producto amarillo se mide a 450 nm. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de reacción.

Cuantificación de citoquinas en suero, tejido pulmonar y tejido intestinal (IL-6, MCP-1, MIP-2, TNF α y IL-1 β)

IL-6

Se homogenizó aproximadamente 50 mg de tejido pulmonar e intestinal. El suero y los homogenizados de tejido previamente se diluyeron a la mitad. La determinación de IL-6 tanto en el plasma como en el homogeneizado del pulmón y del intestino se hizo por

duplicado y se usó el mismo volumen de muestra (200 µl). Para la cuantificación se usó el kit de ELISA para rata IL-6 (R&D Biosystems, Minneapolis, USA). Para la correcta valoración se preparó una curva patrón (2000-62.5 pg/ml). Se utilizó una curva patrón de IL-6 (62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 pg/ml).

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos unidas a anticuerpos monoclonales anti-IL-6 de rata. La placa se incubó durante 2 horas a Temperatura Ambiente (TA). Después se lavó la placa con PBS/Tween-20 0.05% (v/v) para eliminar las proteínas que no se unieron, para a continuación volver a incubar durante 2 h a TA con un segundo anticuerpo policlonal anti-IL-6 unido a una peroxidasa, los cuales se unen a los anticuerpos IL-6 previamente anclados a la placa. Después de este periodo se vuelve a lavar para remover los anticuerpos que no se unieron, para posteriormente incubar con una mezcla de peróxido de hidrógeno y TMB. Dicho reactivo se preparó 15 minutos antes de usarlo. La reacción se paralizó al adicionar ácido clorhídrico diluido y se leyó a una absorbancia de 450 nm en el lector de placas F129024 (TECAN, Genius plus, Australia). La cuantificación de la concentración de IL-6 de las muestras se realizó mediante regresión lineal e interpolación de las absorbancias (450 nm) de las muestras de la curva patrón.

MCP-1

La determinación de MCP-1 en plasma y homogeneizado de tejido pulmonar e intestinal se hizo por duplicado, utilizando el mismo volumen de muestra. El plasma y el homogeneizado previamente se diluyeron cuatro veces.

La cuantificación se llevó a cabo con un ELISA, utilizando el kit de inmunoensayo para rata JE/MCP-1 (R&D Biosystems, Minneapolis, USA). Se emplearon placas de 96 pocillos. Se utilizó una curva patrón de MCP-1 con un rango de (15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml)

Se vertió a cada pocillo 50 µl de la muestra y 50 µl de las distintas concentraciones para la curva patrón (500 -15.6 pg/ml) y se mezcló con 50 µl de PBS/FBS al 10% (v/v). Las muestras fueron incubadas durante 2 h a TA en esta placa cuyos pocillos estuvieron unidos a anticuerpos monoclonales JE/MCP-1 de rata. Seguidamente, se lavó con PBS/Tween-20 0.05% (v/v) para descartar las proteínas que no se unieron. Posteriormente, la placa fue incubada por 2 h a TA con un segundo anticuerpo policlonal JE/MCP-1 anti-rat unido a una peroxidasa que se unirán a MCP-1 previamente unida a los anticuerpos que cubrían la placa. A continuación se procedió a lavar para desprender de los anticuerpos que no se unieron, y seguidamente se incubó 30 minutos con una mezcla de peróxido de hidrógeno y TMB, reactivo que se preparó 15 minutos antes de ser utilizado. La reacción se paralizó con una solución de ácido clorhídrico diluida y se leyó a 450 nm en un lector e placas F129024 (TECAN, Genius plus, Australia). La cuantificación de la concentración de MCP-1 de las muestras se realizó mediante regresión lineal e interpolación de las absorbancias (450 nm) de las muestras de la curva patrón.

MIP-2

La determinación de MIP-2 en plasma y homogeneizado de tejido pulmonar e intestinal se hizo por duplicado. Se utilizó el mismo volumen de muestra. El plasma y los homogeneizados de tejido e intestino no se diluyeron.

El MIP-2 se cuantificó mediante un ELISA, utilizando un kit de inmunoensayo Quantikine ELISA CINC-3 para rata (R&D Biosystems, Minneapolis, USA). Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Para la correcta valoración se utilizó una curva patrón de MIP-2 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/ml.

Se vertió a cada pocillo 50 μ l de la muestra y 50 μ l de las distintas concentraciones para la curva patrón (1000 -31.2 pg/ml) y se mezcló con 50 μ l de PBS/FBS al 10% (v/v). Las muestras fueron incubadas durante 2 h a TA en esta placa cuyos pocillos estuvieron unidos a anticuerpos monoclonales CINC-3/MIP-2 de rata. Seguidamente se lavó con PBS/Tween-20 0.05% (v/v) para descartar las proteínas que no se unieron. A continuación, la placa fue incubada por 2 h a TA con un segundo anticuerpo policlonal CINC-3/MIP-2 anti-rat unido a una peroxidasa, que se unirá a MIP-2 previamente unida a los anticuerpos que cubrían la placa. Después, se procedió a lavar para desprender los anticuerpos que no se unieron y seguidamente se incubó 30 minutos con una mezcla de peróxido de hidrógeno y TMB, reactivo que se preparó 15 minutos antes de utilizarlo. La reacción se paralizó con una solución de ácido clorhídrico diluida y se leyó a 450 nm en un lector de placas F129024 (TECAN, Genius plus, Australia). La cuantificación de la concentración de MIP-2 de las muestras se realizó mediante regresión lineal e interpolación de las absorbancias (450 nm) de las muestras de la curva patrón.

TNF- α

La determinación de TNF- α en plasma y homogeneizado de tejido pulmonar e intestinal se hizo por duplicado, utilizando el mismo volumen de muestra. El plasma y el homogeneizado previamente se diluyen a la mitad.

La cantidad de TNF- α se evaluó por ELISA. Para la cuantificación se utilizó un kit de Inmunoensayo-ELISA Quantikine para TNF- α (R&D Biosystems, Minneapolis, USA). Para la correcta valoración se utilizó una curva patrón de MIP-2 con un rango de 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/ml.

Se utilizó una placa de poliestireno de 96 pocillos, cuya superficie estaba unida a un anticuerpo monoclonal anti TNF- α . Se vertió 50 μ l de muestra y 50 μ l de las diluciones de TNF- α para la curva patrón a los pocillos y se mezcló con 50 μ l de PBS/FBS 10% (v/v). Las muestras se incubaron 2 h a TA luego se lavaron con PBS/ Tween-20 0.05% (v/v) para eliminar proteína que no se unió. Seguidamente, se adicionó un segundo anticuerpo policlonal anti TNF- α unido a una peroxidasa, que se une a TNF- α previamente unido a los anticuerpos de placa. A continuación, se procedió a lavado de la placa para descartar los anticuerpos que no se unieron, para posteriormente adicionar una mezcla de peróxido de hidrógeno y TMB. Este reactivo se preparó 15 minutos antes de la reacción. Finalmente, la reacción se paralizó con una solución de

ácido clorhídrico diluido. Se realizó la medida espectrofotométrica a 450 nm en un lector de placas. F129024 (TECAN, Genius plus Australia). La cuantificación de la concentración de TNF- α de las muestras se realizó mediante regresión lineal e interpolación de las absorbancias (450 nm) de las muestras de la curva patrón.

IL-1 β

La determinación de IL-1 β en plasma, BAL y homogeneizado de tejido pulmonar se hizo por duplicado, utilizando el mismo volumen de muestra. Se hizo una dilución de 1/10 en el plasma. En el homogeneizado de tejido pulmonar no se hizo dilución. Para la correcta valoración se utilizó una curva patrón de IL-1 β (31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/ml).

La cantidad de IL-1 β se evaluó por ELISA. Para la cuantificación se utilizó un kit de Inmunoensayo-ELISA Quantikine para IL-1 β (R&D Biosystems, Minneapolis, USA).

Se utilizó una placa de poliestireno de 96 pocillos, cuya superficie estaba unida a un anticuerpo monoclonal anti IL-1 β . Se vertió a los pocillos 50 μ l de muestra y 50 μ l de las diluciones de IL-1 β para la curva patrón y se mezcló con 50 μ l de PBS/FBS 10% (v/v).

Las muestras se incubaron 2 h a TA. A continuación, lavaron con PBS/ Tween-20 0.05% (v/v) para eliminar proteína que no se unió. Seguidamente, se adicionó un segundo anticuerpo policlonal anti IL-1 β unido a una peroxidasa que se une a IL-1 β previamente unido a los anticuerpos de la placa. Posteriormente, se procedió a lavado de la placa para descartar los anticuerpos que no se unieron, y se adicionó una mezcla de peróxido de hidrógeno y TMB.

Este reactivo se preparó 15 minutos antes de la reacción. Finalmente, la reacción se paralizó con una solución de ácido clorhídrico diluido. Se realizó la medida espectrofotométrica a 450 nm en un lector de placas (F129024 TECAN, Genius plus, Australia). La cuantificación de la concentración de IL-1 β de las muestras se realizó mediante regresión lineal e interpolación de las absorbancias (450 nm) de las muestras de la curva patrón.

Semicuantificación de TLR-4 por electroforesis y Western blot

Las proteínas del tejido pulmonar fueron extraídas y su concentración se determinó mediante el ensayo de BCA (ver Capítulo 2, puntos 4.9 y 4.10). Según la concentración obtenida se calculó el volumen de muestra a cargar en el gel para 40 μ g de proteínas.

Se separó 40 μ g de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico unidimensional (poliacrilamida 40%, TrisHCl 1M pH 8.8, SDS 10%, persulfato de amonio 10%, TEMED), siendo el gel concentrador del 5% y el separador del 8% de acrilamida. Se cargó en los pocillos del gel cada muestra. Se aplicó un voltaje de 150 V y 0,6 A durante una hora en una cámara fría.

Transcurrido la hora de desarrollo electroforético, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, Germany CA). La transferencia se desarrolló a 150 V, 0.4 A, durante 1,5 h, en frío y con tampón de transferencia compuesto por Tris-HCl 25 Mm pH 7.4, glicina 190 Mm y metanol al 20% (v/v).

Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron incubadas en tampón de bloqueo [leche al 5% (p/v) disuelta en PBS y Tween-20 al 0,1% (v/v)] durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se adicionó el anticuerpo primario anti TLR-4 (anticuerpo monoclonal anti TLR-4 desarrollados en ratón por Abcam [76B357.1]. United Kingdom) a una dilución de 1:500 en el tampón de lavado [PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v)] y se incubó durante la noche a 4°C.

Las membranas fueron incubadas en tampón de lavado más el anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado a peroxidasa (Cell Signaling technology [#7076]), a una dilución (1:1000) en el tampón de lavado durante 2 horas a TA. Posteriormente, tras una serie de lavados, la señal fue revelada por quimioluminiscencia, incubando la membrana 5 minutos en oscuridad con ECL (Millipore, Billerica, MA). Seguidamente, se colocó la membrana rápidamente entre dos plásticos lisos inmovilizados y se introdujo en la máquina reveladora. Se repitieron las exposiciones a diferentes tiempos, para conseguir la intensidad correcta.

La semicuantificación se hizo por densitometría usando un programa Quantity One (Bio- Rad Laboratorios Hercules, USA).

Para verificar la cantidad de proteína cargada, las membranas fueron incubadas durante 30 minutos, a TA y agitación constante en la solución de stripping (Glicina 1M pH 2,5 [Cf=200 mM] 10mL, SDS 20% 2ml y Agua destilada 38 ml) para desmontar los anticuerpos añadidos a la membrana. Posteriormente, se lavó 3 veces por 10 minutos a TA con el tampón de lavado. A continuación, se bloqueó de nuevo 1 hora a temperatura ambiente en agitación con la solución de bloqueo. Se incubó con el anticuerpo monoclonal primario anti β - actina (anticuerpo monoclonal β -actina desarrollado en ratón, Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.) a una concentración de 1 μ g/ml.

Análisis de expresión de genes de las citoquinas:IL-6, MCP-1, MIP-2, TNF- α , CCR2 y CXCR2 en tejido pulmonar e intestinal (RT-Q-PCR a tiempo real)

Extracción y Cuantificación del RNAm

Para aislar el RNA en tejido pulmonar (muestra de lóbulo inferior derecho) se utilizó el RNeasy Mini kit (Quiagen, Hilden,Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se pesó aproximadamente 50 mg de tejido pulmonar congelado y se introdujo, junto con 600 μ l del tampón de lisis β - mercaptoetanol:Tampon RLT plus (1:100), en el interior de un tubo con perlas de cerámica. Estos tubos se colocaron en el interior de un aparato MagNalyser (Rochediagnostics GmbH Mannheim, Germany).

El homogenizado se centrifugó por un minuto a 130000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfirió a una columna para eliminar el DNA genómico proporcionado por el

fabricante. A continuación se procedió a centrifugado a 8000 g durante 30 segundos a 4°C.

El eluido se mezcló con etanol al 70% y esta solución se transfirió a una columna RNase spin que retiene el RNA en la membrana. Posteriormente, se centrifugó 30 segundos a 8000 g a 4°C, hasta que todo el fluido atraviesa la columna y se descarta el eluido.

La columna se lavó y se trató con un kit RNasa libre de DNasa (Quiagen, Hilden, Germany) durante 20 minutos, para eliminar alguna traza de DNA que contamine la muestra. Seguidamente, se lavó varias veces y la columna se centrifugó 1 minuto a 16000 g para eliminar posibles trazas de DNA. Finalmente, se añade a la columna 40 µl de agua libre de RNasa para obtener en el eluido el RNA.

Para la valoración de la concentración y pureza del RNA, se realizó una lectura espectrofotométrica por duplicado a 260 y 280 nm (espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, Nano Drop Technologies Inc, Wilmington, DE).

La lectura a 260 nm permitió calcular la concentración del ácido nucleico en la muestra (1 unidad de DO corresponde a una concentración de 40 µg/ml de RNA)

La relación entre absorbancia A260/A280 indica el grado de pureza de la muestra. Cuando la relación entre 1,8-2,1 es un indicativo de un buen grado de pureza de RNA. 280 nm es el pico de absorción de las proteínas o del fenol. Se considera que una relación de 1,9-2,1 es indicativa de un buen grado de pureza de RNA (Sambrook y cols. Manual de laboratorio: Clonación molecular. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989 4^{ta} edición)

Transcripción reversa (síntesis de cDNA)

La transcripción reversa fue realizada usando 1 µg de RNA total y siguiendo las instrucciones del kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptions (Applied Biosystems. USA).

En primer lugar, se preparó una solución a una concentración 2x de la Reverse Transcriptions Master Mix, cuyos componentes se reflejan en la tabla 1.

Se utilizó una placa de 96 pocillos. Se vertió 10 µL a cada pocillo de la Reverse Transcriptions Master Mix 2x y 10 µl de la muestra de RNA total, con un volumen final de 20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador. La PCR se programó con las siguientes condiciones: 25°C 10 minutos y 37°C 120 minutos. Se detuvo la reacción inactivando la enzima a 85°C 5 minutos. El cDNA resultante se guardó a -80°C hasta su uso.

Tabla 1. Componentes la de Transcripción Reversa *Master Mix*

Componentes	Volumen /Reacción (µL)
Buffer RT 10X	2.0
dNTP Mix (100Mm) 25X	0.8
RT Random Primers 10X	2.0
Transcrptasa reversa MultiScribe™	1.0
Inhibidor de la RNasa	1.0
Agua libre de nucleasas	3.2
Total de reacción	10.0

Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real

Para estos ensayos, se partió del cDNA obtenido según se explica en el apartado anterior. Para la qPCR en tiempo real se utilizaron los siguientes ensayos diseñados y validados por TaqMan Gene Expresión Assay (Applied Biosystems, USA): MCP-1 (Rn00580555_m1), TNF- α (Rn01525859_g1), CCL2 (Rn00580555_m1), IL-6 (Rn99999011_m1), CCR2 (Rn01637698_s1), CXCR2 (Rn02130551) y para el gen normalizador 18S (Hs99999901_s1).

Una vez preparada la mezcla de reacción (Tabla 2), las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA). Se utilizó un sistema de detección basado en colorantes fluorescentes acoplados a las sondas (6FAM para los genes de citoquinas y VIC® para el gen normalizador). La qPCR se programó con las siguientes condiciones de reacción: 50°C 2 minutos y desnaturalización y activación del AmpliTaq Gold, UP(UltraPure) enzyme a 95°C 10 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C 15 segundos, anillamiento a 60°C 60 segundos.

Los resultados se analizaron por el método del C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) (Livak 2001), normalizando con los niveles de expresión de 18s mediante el *software* 7500 Fast Real-Time PCR system (Version 2.01) (USA). Los datos finales fueron representados como los cambios de expresión normalizados.

Tabla 2. Mezcla de Reacción para la Q-PCR

Componentes de Reacción	Volumen por 50 µl de muestra	Volumen por 20 µl de muestra	Concentración final
TaqMan Gene Expression Master Mix (2x)	25.0	10.0	1X
Forward primer	5.0	2.0	50-900 nM
Reverse primer	5.0	2.0	50-900 nM
TaqMan probe	5.0	2.0	50 a 250 nM
Muestra de DNA	5.0	2.0	10 a 100 ng
Agua	5.0	2.0	-
Total	50.0	20.0	-

Análisis histológico de los pulmones

Se practicó una esternotomía para aislar el bloque cardiopulmonar. El bronquio izquierdo se disecó y se canalizó con un Abbocath 16G para instilar formaldehído al 4%. Seguidamente, se sumergió el pulmón izquierdo en un envase con formaldehído al 4% y se guardó a TA durante 48 horas.

Protocolo

- a) El tejido se fijó en formaldehído al 4% como previamente se ha descrito.
- b) El tejido se cortó transversalmente en tres secciones de 3 mm de espesor (al nivel del hilo, inmediatamente por encima e inmediatamente por debajo). Posteriormente, la muestra fue deshidratada con alcoholes escalonados en graduación creciente (60%, 65%, 95% y alcohol absoluto).
- c) Se eliminó el alcohol del tejido mediante xileno.
- d) Se incluyó e infiltró el tejido en parafina. La temperatura no excedió los 58°C.
- e) Se cortó en secciones de 7 µm y se montó sobre un portaobjetos de cristal limpio. Se aplicó una capa de adhesivo o un agente sustitutivo como la poli-L-lisina, que mejora la adherencia del tejido.
- f) Se secó al aire entre 12 a 24 horas a TA toda la noche a 37°C.
- g) Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE).

Tinción con HE

Existen múltiples variantes de tinción con HE, según se emplee un tipo u otro de eosina y de hematoxilina (p.ej., Harris). Por lo común, este método siempre consta de una fase inicial, en la que se colorean los núcleos celulares con la hematoxilina, y una

fase ulterior de contraste citoplasmático y de los componentes extracelulares con la eosina.

Resultados:

- Núcleos: azul negro.
- Eritrocitos: de naranja a rosa.
- Estructuras restantes: de rosa a rojo.

Se eligieron diez campos de cada sección, que fueron analizados por el patólogo mediante microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i microscopy). Para cuantificar el daño pulmonar se empleó un índice basado en trabajos precedentes de Muscedere y Kavanagh [89] según ha sido utilizado previamente por nuestro grupo. Este índice se basa en el hallazgo de necrosis de neumocitos tipo I y formación de membranas hialinas. Se asigna una puntuación de 0 (ausencia de membranas), 1 (membranas hialinas presentes en 1-25 por cada 100 campos), 2 (membranas hialinas presentes en 26-50 campos por cada 100 campos), 3 (membranas hialinas presentes en 51-75), y 4 (membranas hialinas presentes en >75 campos por cada cien campos).

Evaluación de la apoptosis (método TUNEL)

Para evaluar si la intensidad de la apoptosis se utilizó el método TUNEL (*TdT mediated dUTP Nick-end labelling*). Este método consiste en la adición de trifosfonucleótidos marcados (dUTP u otros) a las hebras fragmentadas del DNA en su extremo 3-OH (tanto en *nicks* como en roturas de doble cadena) empleando la trifosfodeoxinucleotidil transferasa terminal. El procedimiento consiste en fijar y permeabilizar las células, adicionar los nucleótidos y la TdT y, una vez finalizada la polimerización, se detecta directamente la fragmentación del DNA mediante la adición de fluoróforos o indirectamente mediante la adición de anticuerpos.

Se hicieron cortes de 4 μm de grosor del tejido pulmonar embebido en parafina y se hizo una tinción con fluoróforos (TUNEL) siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics). Para la observación, análisis y lectura se usó un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51 model, Japón).

El análisis y cuantificación de las células TUNEL-positivas se hizo de forma ciega en ocho campos de forma aleatorizada, con varias amplificaciones.

Los cortes de tejido pulmonar embebidos en parafina fueron desparafinados con calor a 60°C y xileno, rehidratados con etanol al 100%, 95% y 70%, e incubados con proteinasa K a 37°C durante 30 minutos, y aclarados dos veces con un tampón fosfato salino (PBS 1X –Dulbecco’s Phosphate-Buffer Saline. Gibco Grand Island, NY E.U). Se preparó la mezcla de reacción de TUNEL siguiendo las instrucciones del fabricante (450 μl de solución de marcaje y 50 μl del enzima), mantenido en hielo hasta el momento de su uso. Se encubó con 50 μl de mezcla de reacción TUNEL cada corte a 37°C durante 60 minutos en un ambiente húmedo en ausencia de luz

ambiental. Para el control negativo adicionamos al corte sólo 50 μ de solución de marcaje.

Para la preparación microscópica, los cortes se montaron en portaobjetos con PBS/glicerol. Las imágenes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro verde con una longitud de onda entre 515-565 nm.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas se compararon mediante el test de la chi cuadrado. Las variables cuantitativas se compararon mediante un ANOVA para varios factores, según el diseño del experimento. Por ejemplo, considerando los factores V_T y tratamiento con DDS. Se describe la significación estadística de la comparación de los grupos dos a dos, utilizando la corrección de Bonferroni, cuando el ANOVA de la comparación global indica un efecto significativo ($p < 0.05$).

La identificación del valor de presión en la vía aérea que se asocia con mayor daño pulmonar se realizó mediante el análisis del área bajo la curva ROC, seleccionando el valor de presión en la vía aérea con mayor sensibilidad y especificidad.

Los valores se representan como media \pm error típico (error estándar).

Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

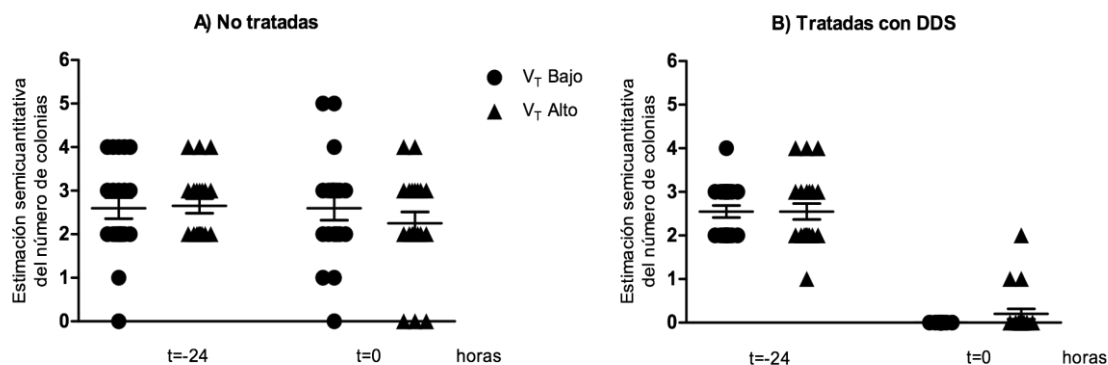
5. Resultados

Efectos de la DDS sobre el crecimiento de bacterias del tracto digestivo

Para verificar que las ratas fueron descontaminadas de forma eficaz, se obtuvo una muestra de exudado rectal mediante hisopado antes de recibir la DDS o vehículo 24 horas antes del experimento (período de ventilación mecánica, que se inició a $t=0$ min). El hisopado se sembró siguiendo el método del cuarto cuadrante y 48 horas después se hizo una estimación semicuantitativa, según el método de Leonard (como se describe en el capítulo 1).

Nuestros resultados indican que en situación basal (antes de administrar el tratamiento con DDS o vehículo) se identificaron bacterias Gram-negativas, que fueron erradicadas 24 horas tras la administración de DDS o vehículo (Fig.1B). La figura indica el conteo de bacterias antes de la primera dosis de DDS y 24 horas después, tanto en las ratas que subsiguientemente (tras el segundo cultivo) iban a recibir V_T bajo como las que iban a recibir V_T elevado. Tan sólo tres animales (en el grupo de V_T alto) permanecieron sin descontaminar a las 24 horas de la dosis de DDS.

Figura 1. Recuento semicuantitativo de bacilos entéricos Gram-negativos (cultivo fecal) a las 24 horas de tratamiento



Valoración semicuantitativa (Índice de crecimiento bacteriano)		
1+	1-10	ufc/ml
2+	³ 10-10	ufc/ml
3+	³ ⁵ 10 -10	ufc/ml
4+	⁵ ⁷ 10 -10	ufc/ml
5+	⁷ 10 o más	ufc/ml

En A y B se hizo un recuento semicuantitativo de enterobacterias gram-negativas tras la administración de DDS y 24 h después de la dosis de DDS (justo antes del inicio del periodo de ventilación mecánica de 2,5h de duración). *p<0,05 versus recuento antes de la dosis de DDS

Efectos de la DDS sobre la estructura y función de los diferentes órganos

Efectos sobre la función cardiovascular (Tabla 3, Fig.2)

Los valores registrados a lo largo del experimento están dentro de un rango normal para la rata.

Efecto de la ventilación mecánica

El grupo de ratas ventiladas con V_T elevado (no tratadas con DDS) presentó al final del experimento (t=150 min) una PAM significativamente menor que al inicio (t=0 min).

Asimismo, las ratas que recibieron un V_T bajo presentaron al final del experimento (t=150 min) una PAM significativamente menor que el inicio (t=0 min).

El cambio de la PAM a lo largo del tiempo desde $t=0$ min hasta el $t=150$ min (delta de PAM) fue mayor aunque no de forma significativa en los animales que recibieron V_T elevado que en aquellos que recibieron V_T bajo.

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS no indujo ningún cambio en la PAM de los animales sometidos a V_T bajo.

Efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

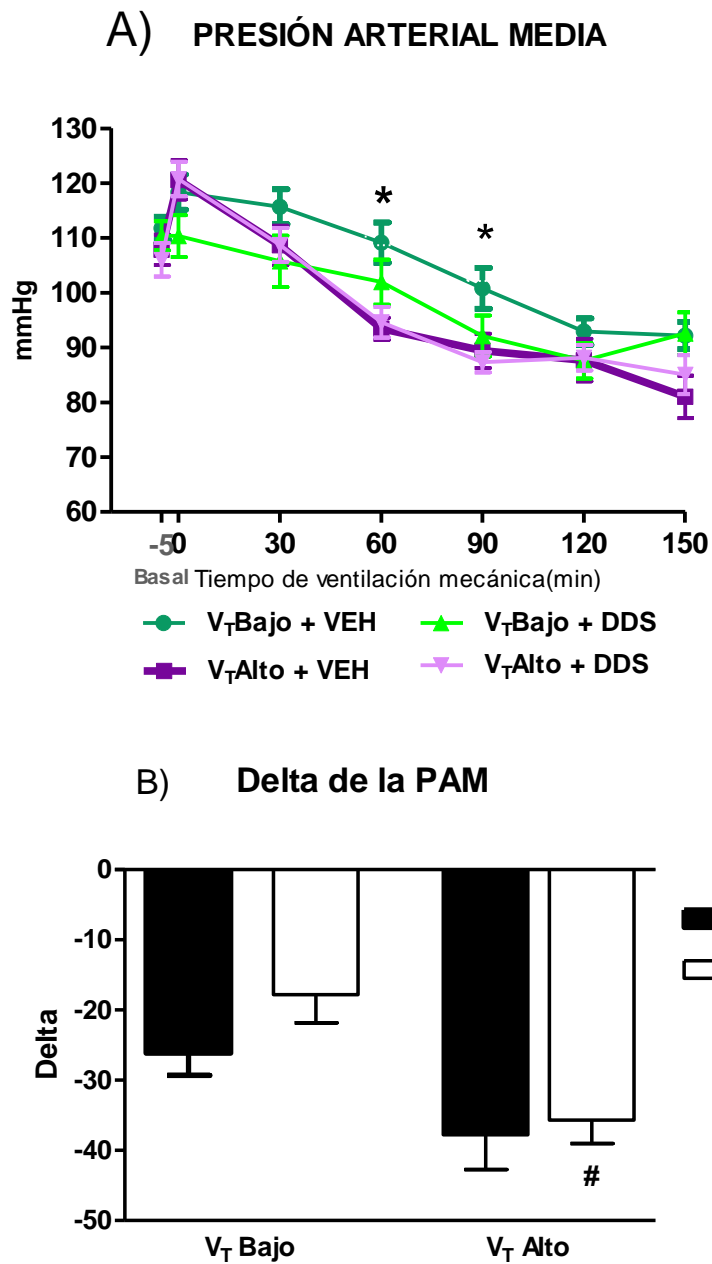
El grupo de ratas ventiladas con V_T elevado (en ratas tratadas con DDS) presentó al final del experimento ($t=150$ min) una PAM significativamente menor que al inicio ($t=0$).

Asimismo, las ratas que recibieron V_T bajo presentaron al final del experimento ($t=150$ min) una PAM significativamente menor que al inicio ($t=0$ min).

El cambio de la PAM a lo largo del tiempo desde el $t=0$ hasta el $t=150$ (delta de PAM) fue significativamente mayor en los animales que recibieron V_T elevado que en aquellos que recibieron V_T bajo.

En resumen, la aplicación de V_T elevado se asocia con una disminución progresiva de la PAM (que alcanza la significación estadística sólo en el grupo tratado con DDS).

Figura 5. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la presión arterial media



El valor delta indica la diferencia entre t=0 y el t=150 min. Los valores son media \pm DE

A) V_T Bajo + VEH* $p < 0.05$ vs V_T Alto + VEH

B) # $p < 0.05$ vs V_T Bajo + DDS

Tabla 10. Efecto de la ventilación mecánica y de la DDS sobre la presión arterial media (mmHg).

	V _T	Tratamiento	t=0	t=150
PAM (mmHg)	V _T Bajo	VEH	118±14,4	92±11,2 ¶
		DDS	110±17,1	93±17,3 ¶
	V _T Alto	VEH	120±16,2	82±17,3 ¶
		DOS	120,8±14	85,1±16 ¶

El valor delta indica diferencia entre el t=0 y el t=150 min. Los valores son media±DE

¶ p<0.05 vs. T=0 min

*p<0.05 vs. V_T Bajo + VEH

#p<p<0.05 vs. V_T Bajo + DDS

Efectos sobre la mecánica respiratoria

Presión pico de la vía aérea (Tabla 4, Fig.3)

Se observó un aumento de la PIP desde t=-5 min (basal) a t=0 min en los animales sometidos a V_T elevado (al inicio del experimento), debido al aumento de flujo inspiratorio para alcanzar el V_T deseado (25 ml/kg).

Efecto de la ventilación mecánica

La PIP aumentó significativamente desde el t=0 min en los animales sometidos a V_T elevado, mientras no se apreció ningún cambio en la PIP en los animales que recibieron V_T bajo.

El cambio de la PIP desde el t=0 min hasta t=15 min (delta de PIP) fue significativamente mayor en los animales que recibieron V_T elevado que en los que recibieron V_T bajo.

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS no se asoció con un cambio alguno en la PIP (en los valores basales en su evolución a lo largo del tiempo) en los animales que recibieron V_T bajo.

Efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

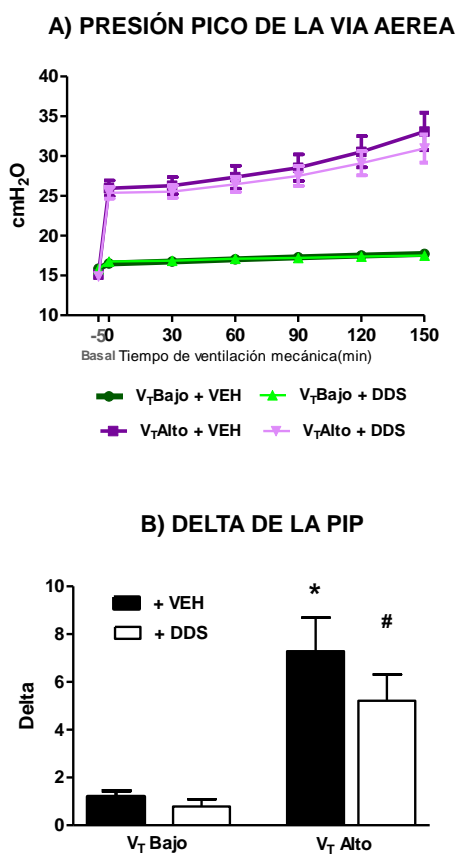
La administración de V_T elevado (en ratas tratadas con DDS) se asoció con una elevación significativa de la PIP desde el t=0 min hasta el t=150 min.

El incremento de la PIP (delta de PIP) inducido por la ventilación mecánica con V_T a lo largo del experimento fue similar en el grupo tratado con DDS que en el grupo tratado con vehículo.

En resumen,

- (a) La aplicación de V_T elevado se asocia con el aumento de la PIP.
- (b) El tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica sobre la evolución de la PIP.

Figura 3. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre parámetros ventilatorios: presión pico de la vía aérea (PIP)



El valor delta indica la diferencia entre el t=0 y el t=150 min. Los valores son media±DE

*p<0.05 vs. V_T Bajo + VEH;

#p<0.05 vs V_T Bajo + DDS

Tabla 4. Efecto de la ventilación y del tratamiento con DDS sobre parámetros ventilatorios: presión pico de la vía aérea (cm H₂O)

V _T	Tratamiento	t=5min	t=150min	Delta
V_T Bajo	VEH	17±2,2	18±1,9 ¶	1±1,3
	DDS	17±2,2	18±1,7	1±1,3
V_T Alto	VEH	26±4,3	33±10,4 ¶	7±6,5 *
	DDS	25,4±3,3	31±7,9	5,6±4,9 #

El valor delta indica la diferencia entre el t=0 y el t=150 min. Los valores son media ± DE

¶p<0.05 vs. t=0 min; *p<0.05 vs. V_T Alto + VEH; #p<0.05 vs. V_T Bajo + DDS

Distensibilidad del sistema torácico (C_{RS}) (Tabla 5, Fig.4)

Se apreció un aumento de la compliance desde t=-5 min hasta t=0min (al inicio del experimento) en los animales sometidos a V_T elevado, debido al aumento de flujo necesario para alcanzar el V_T deseado (25ml/kg).

Efecto de la ventilación mecánica

Se observó un descenso progresivo de C_{RS} desde t=0min hasta t=150min en ratas sometidas a V_T Bajo (En ratas no tratadas con DDS).

El cambio de C_{RS} en el tiempo desde t=0 min hasta t=150 min (delta) fue mayor en el grupo que recibió V_T elevado que en el que recibió V_T Bajo.

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS no se asoció con ningún cambio en la distensibilidad del sistema respiratorio en ratas sometidas a V_T bajo, ni en los valores basales ni en su evolución en el tiempo.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

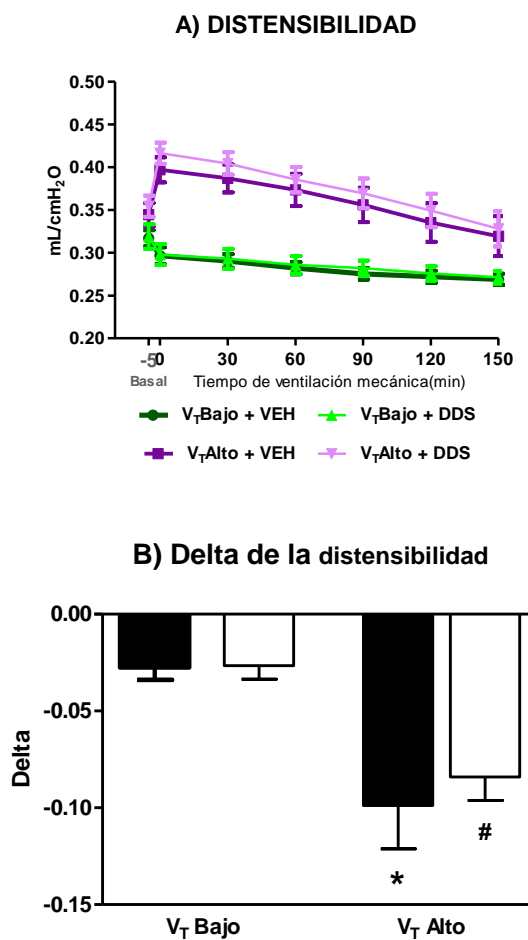
En ratas tratadas con DDS se observó una disminución de la C_{RS} desde el t=0min hasta el t=150 min, de forma similar a la disminución observada en animales no tratados con DDS.

La disminución progresiva de la distensibilidad desde t=0min hasta t=150 min (delta) inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado fue similar en el grupo tratado con DDS en comparación con el grupo no tratado.

En resumen,

- (a) La aplicación de V_T elevado se asocia con una disminución de la distensibilidad del sistema respiratorio al final del experimento.
- (b) El tratamiento de la DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la evolución de la distensibilidad.

Figura 4. Efecto de la ventilación y del tratamiento con DDS sobre la distensibilidad



El valor delta indica la diferencia entre el t=0 y el t=150 min. Los valores son media \pm DE.

* $p < 0.05$ vs V_T bajo + VEH

$p < 0.05$ vs V_T bajo + DDS

Tabla 5. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la distensibilidad (ml/cm H₂O)

V _T	Tratamiento	t=5min	t=150min	Delta
V_T Bajo	VEH	0,30±0,05	0,27±0,04 ¶	-0,03±0,03
	DDS	0,30±0,1	0,027±0,03	-0,03±0,03
V_T Alto	VEH	0,34±0,1	0,30±0,1 ¶	-0,09±0,04 *
	DDS	0,42±0,1	0,33±0,1 ¶	-0,08±0,05 #

El valor delta indica la diferencia entre el t=0 y el t=150 min
 Los valores delta indica la diferencia entre el t=0 y el t=150 min. Los valores son media ± DE.
 *p<0.05 vs V_T Bajo + VEH; #p<0.05 vs V_T Bajo + DDS

Resistencia de la vía aérea (R_{VA}) (Fig. 5, Tabla 6)

Se apreció un aumento de la R_{VA} al inicio del experimento, desde el t=-5 min (basal) hasta el t=0 min en los animales sometidos a V_T elevado, debido al aumento del flujo inspiratorio necesario para alcanzar el V_T deseado (25ml/kg).

Efecto de la ventilación mecánica

La administración de VT elevado desde el t = 0 min hasta t = 150 min se asoció con un aumento significativo de la R_{VA}, que no se apreció en el grupo que recibió V_T Bajo.

El cambio de R_{VA} en el tiempo desde t = 0 min hasta t = 150 min (delta) fue mayor en el grupo que recibió V_T elevado que en el que recibió V_T bajo.

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS en animales que recibieron V_T Bajo no se asoció a ningún cambio en la R_{VA}, ni en los valores basales ni en su evolución en el tiempo.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

En los animales tratados con DDS no se observó un aumento de la R_{VA} desde t = 0 min hasta t = 150 min (a diferencia de los animales no tratados con DDS, en los ue se apreció un cambio significativo de la R_{VA} en el tiempo).

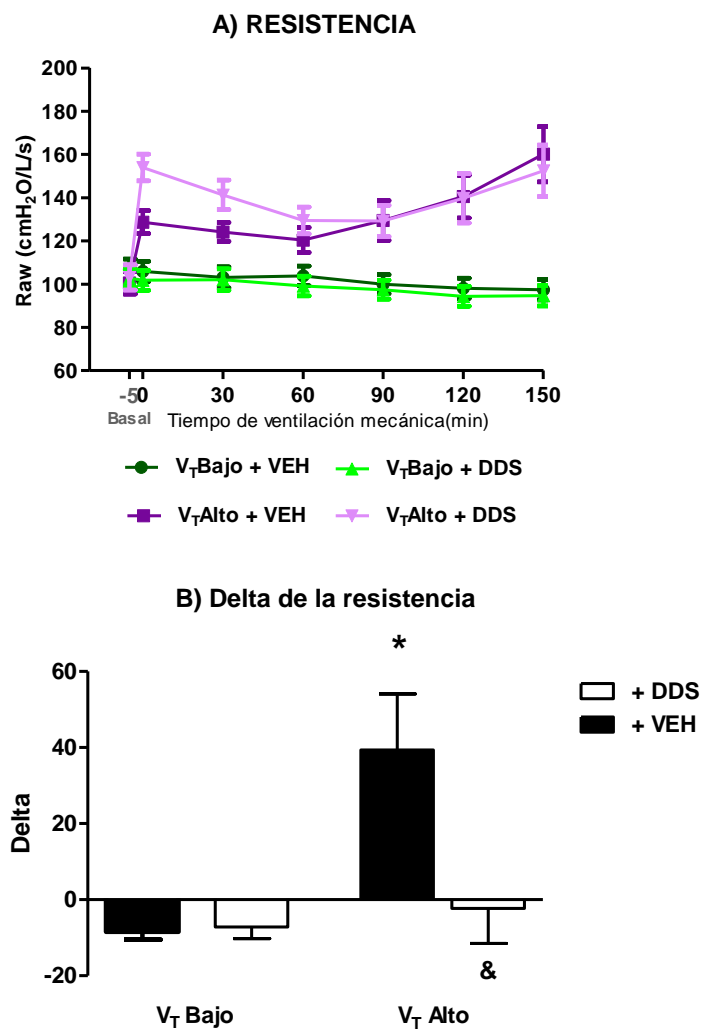
El cambio en el tiempo desde t = 0 min hasta t = 150 min (delta R_{VA}) fue menor en los animales tratados con DDS que en los animales no tratados.

En resumen,

(a) La aplicación de V_T elevado se asoció con un aumento de R_{VA} al final del experimento.

(b) El tratamiento con la DDS atenúa el cambio inducido por la ventilación mecánica (V_T Alto) sobre la evolución de la R_{VA} .

Figura 5. Efecto de la ventilación y del tratamiento con DDS sobre la resistencia



El valor delta indica la diferencia entre el $t=0$ y el $t=150$ min. Los valores son media \pm DE

* $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH;

$p < 0.05$ vs. V_T Bajo + DDS;

& $p < 0.05$ vs. V_T Alto + VEH

Tabla 6. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la resistencia de la vía aérea (cm H₂O/L/s)

V _T	Tratamiento	t=5min	t=150min	Delta
V _T Bajo	VEH	106±20,7	97±20,9	-8±9,2
	DDS	102±20,6	95±21,3	-7±13,9
V _T Alto	VEH	129±23,8	167±58,8 ¶	39±58,9 *
	DDS	154±27,7	148,±55,7	-1,9±39,5 &

El valor delta indica la diferencia entre el t=0 y el t=150 min. Los valores son media ±DE.

¶p<0.05 vs. t=0 min; *p<0,05 vs. V_T Bajo + VEH; #p<0.05 vs. V_T Bajo + DDS; &p<0.05 vs. V_T Alto + VEH

Efectos sobre la función pulmonar (Fig. 9, Tabla 7)

La función pulmonar fue valorada mediante la medición del intercambio gaseoso y de la permeabilidad alveolo-capilar.

Intercambio gaseoso (Tabla 7)

Las gasometrías se determinaron en muestras de sangre obtenidas antes del inicio de la ventilación mecánica (t = -5min, basal), y al finalizar el experimento (t = 150min).

Los valores basales (t = -5 min) de los gases arteriales y lactato fueron similares en todos los grupos.

Efecto de la ventilación mecánica

El grupo que recibió V_T elevado presentó una disminución de la PaO₂ desde el t = 0 min hasta t = 150 min (que no alcanzó la significación estadística), mientras que el grupo que recibió un V_T bajo no presentó cambios en la PaO₂.

El cambio de la PaO₂ en el tiempo desde t = 0 min hasta t = 150 min (delta PaO₂) fue mayor en los animales que recibieron V_T elevado que en los que recibieron V_T Bajoajo (no llegando la diferencia a la significación estadística).

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS no se asoció a cambios en la oxigenación en el grupo que recibió V_T Bajo, ni en los valores basales ni en su evolución en el tiempo.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

Los animales que recibieron DDS presentaron una disminución estadísticamente significativa de la PaO_2 desde el $t=0$ min hasta 150 min.

El cambio de la PaO_2 inducido por la administración de V_T elevado desde el $t=0$ min hasta $t=150$ min (delta de PaO_2) fue mayor en el grupo tratado con DDS que en el grupo no tratado.

Los demás valores de gases arteriales y lactato no cambiaron durante el experimento en ninguno de los subgrupos.

En resumen,

(a) La aplicación de V_T elevado no se asoció con un deterioro significativo en la oxigenación.

(b) El tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica (V_T alto) sobre la oxigenación.

Tabla 7. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre el intercambio gaseoso y la lactatemia

Ventilación mecánica (V_T Alto) sobre la oxigenación

	V _T	Tratamiento	t=5min	t=150min	Delta
pH	V _T Bajo	VEH	7,39±0,07	7,38±0,07	-0,01±0,07
		DDS	7,43±0,06	7,42±0,06	-0,06±0,054
	V _T Alto	VEH	7,38±0,07	7,32±0,07	-0,06±0,094
		DDS	7,40±0,06	7,35±0,05	-0,04±0,08
Pa CO₂ (mmHg)	V _T Bajo	VEH	27,47±6,82	27,74±5,93	0,26±4,67
		DDS	25,32±4,58	24,58±4,26	-0,732±4,09
	V _T Alto	VEH	28,85±5,43	31,45±4,33	2,6±6,55
		DDS	27,89±6,16	31,00±4,09	3,11±5,88
PaO₂ (mmHg)	V _T Bajo	VEH	170,42±20,59	175,42±23,02	5,0±13,54
		DDS	171,84±17,12	177,16±19,38	5,32±10,24
	V _T Alto	VEH	165,50±14,62	143,55±65,24	-21,95±64,15
		DDS	170,316±12,18	133,05±69,66	-37,26±63,56 #
HCO₃⁻ (mmol/L)	V _T Bajo	VEH	16,51±1,64	16,27±1,69	-0,24±1,25
		DDS	16,44±1,86	15,83±1,99	-0,616±2,412
	V _T Alto	VEH	16,82±1,95	16,17±2,21	-0,68±1,56
		DDS	17,15±2,34	17,22±2,49	-0,068±1,56
Lactato	V _T Bajo	VEH	2,44±1,01	0,98±0,33	-1,46±0,99
		DDS	2,27±1,06	1,03±0,16	-1,24±1,04

El valor delta indica la diferencia entre t=0 y el t=150 min. Los valores son media ± DE

PaCO₂, presión parcial de dióxido decarbono arterial.

PaO₂, presión parcial de oxígeno arterial

HCO₃, bicarbonato arterial

¶p<0.05 vs. t=0 min

*p<0.05 vs. V_T Bajo + VEH

Permeabilidad alveolo-capilar: concentración de proteínas en el LBA (Fig. 6)

Efecto de la ventilación mecánica

El grupo de ratas ventiladas con VT Alto (en ratas no tratadas con DDS) presentó una mayor concentración de proteínas en el LBA, en comparación con el grupo que recibió VT Bajo.

Efecto de la DDS

La concentración de proteínas en el LBA fue similar en el grupo tratado con DDS que en el grupo no tratado con DDS (para los animales con VT bajo).

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

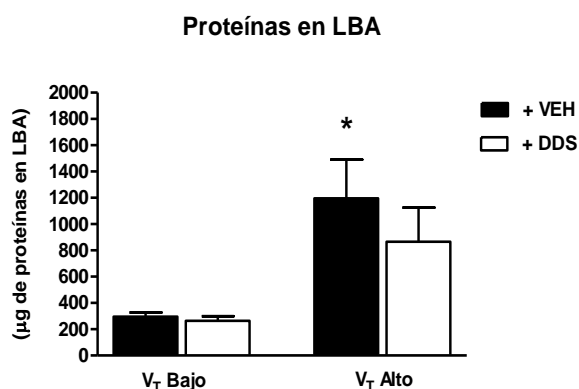
En animales tratados con DDS, la concentración de proteínas en el LBA no fue significativamente diferente en el grupo ventilado con V_T Bajo que el grupo ventilado con V_T elevado (a diferencia de los animales no tratados con DDS, en los cuales la administración de V_T elevado se asoció con una elevación significativa de la concentración de proteínas en el LBA).

Sin embargo, entre los animales que recibieron V_T elevado, no hubo diferencias significativas en la concentración de proteínas en LBA en el grupo que recibió DDS y en el grupo que no recibió DDS.

En resumen:

- (a) La aplicación de V_T elevado se asoció con una elevación de la concentración de proteínas en el LBA, en comparación con la aplicación de un V_T Bajo.
- (b) El tratamiento con DDS atenúa el aumento de la concentración de proteínas en el LBA inducido por la ventilación mecánica (V_T Alto).

Figura 6. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la permeabilidad alveolocapilar



Los valores son media \pm DE

* $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH

Ratio LBA/suero de la concentración de proteínas (Fig. 7)Efecto de la ventilación mecánica

El grupo de ratas ventiladas con V_T alto (no tratadas con DDS) presentó una mayor ratio LBA/suero de la concentración de proteínas que el grupo ventilado con V_T bajo.

Efecto de la DDS

La ratio LBA/suero de la concentración de proteínas fue similar en el grupo tratado con DDS que en el grupo no tratado con DDS (para los animales que recibieron V_T bajo).

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

Entre los animales que recibieron DDS, la administración de V_T elevado (en comparación con la administración de V_T bajo) se asoció con una elevación de la ratio LBA/suero de la concentración de proteínas que no llegó a la significación estadística (a diferencia de los animales no tratados con DDS, en los cuales la administración de V_T elevado se asoció con una elevación significativa de la ratio).

Sin embargo, la ratio LBA/suero de la concentración de proteínas en los animales que recibieron V_T elevado fue similar en el grupo tratado con DDS que en los animales no tratados con DDS.

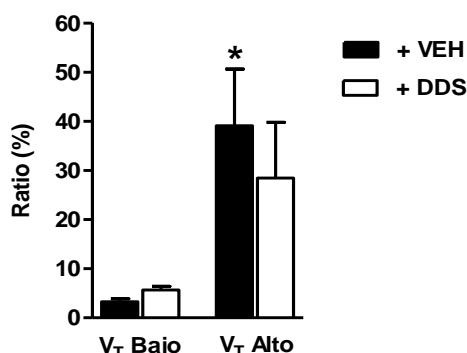
En resumen:

(a) La aplicación de V_T elevado se asoció con una elevación de la permeabilidad alveolo-capilar (medida por la ratio LBA/suero de la concentración de proteínas).

(b) El tratamiento con DDS atenúa el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar asociado a la administración con un V_T elevado

Figura 7. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la ratio de proteínas en el LBA

ratio de proteínas en LBA



Los valores son media ± DE

LBA, lavado broncoalveolar.

Ratio (%), ratio de concentración de proteínas entre LBA y suero.

*p<0.05 vs. V_T Bajo + VEH

Concentración de la IgM en el LBA (Fig. 8)

Efecto de la ventilación mecánica

El grupo de ratas ventiladas con V_T alto (en ratas no tratadas con DDS) presentó una mayor concentración de IgM en el LBA que en el grupo de ratas ventiladas con V_T bajo.

Efecto de la DDS

La concentración de IgM en el BAL fue similar en el grupo tratado con DDS que en el grupo no tratado con DDS (para los animales ventilados con V_T bajo).

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

La administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) se asoció con una mayor concentración de IgM en el LBA (de forma semejante al efecto de la administración de V_T elevado observado en animales no tratados con DDS).

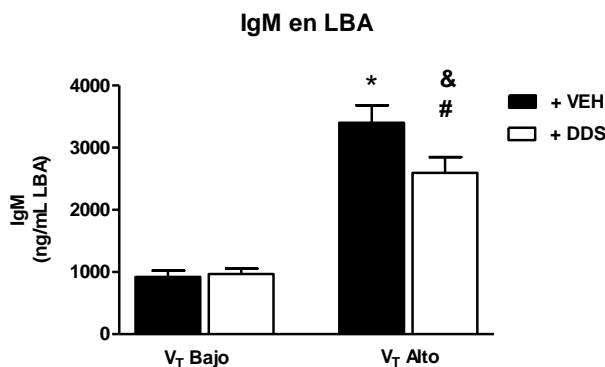
Sin embargo, la concentración de IgM en el LBA de animales que recibieron V_T elevado fue significativamente menor en el grupo tratado con DDS que en el grupo no tratado con DDS.

En resumen:

- (a) La aplicación del V_T elevado se asoció con un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar (valorada por la concentración de IgM en el LBA).

(b) El tratamiento con DDS atenúa el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar inducido por la ventilación mecánica con VT elevado.

Figura 8. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la permeabilidad alveolocapilar



Los valores son media \pm DE. LBA, lavado broncoalveolar

* $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH

$p < 0.05$ vs. V_T Bajo + DDS

& $p < 0.05$ vs. V_T Alto + VEH

Efectos sobre la histología pulmonar (Fig. 9 y 10)

Efectos de la ventilación mecánica

El grupo de ratas ventiladas con V_T alto (no tratadas con DDS) presentó un mayor índice de daño pulmonar, en comparación con la administración de V_T Bajo.

Efecto de la DDS

No se encontraron cambios histológicos en las ratas tratadas con DDS en comparación con las no tratadas con DDS.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

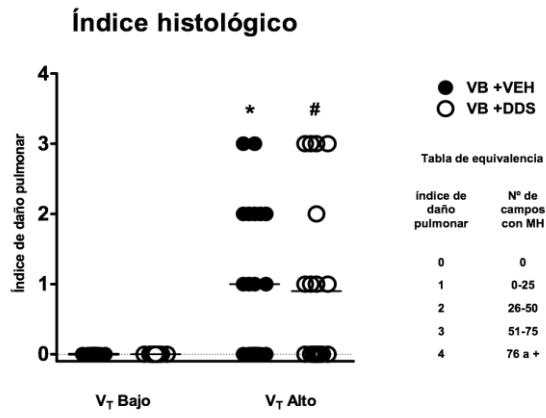
En los animales tratados con DDS, la administración de V_T elevado (en comparación con V_T bajo) se asoció con un mayor daño histológico (de forma semejante al efecto de la administración de V_T elevado observado en ratas no tratadas con DDS).

El daño histológico pulmonar en animales que recibieron V_T elevado fue similar en el grupo tratado con DDS que el grupo no tratado con DDS.

En resumen,

- (a) La aplicación de V_T elevado se asoció con cambios histológicos pulmonares.
- (b) El tratamiento con DDS no afecta a los cambios histológicos inducidos por la ventilación mecánica utilizando V_T Alto.

Figura 9. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre los cambios histológicos pulmonares

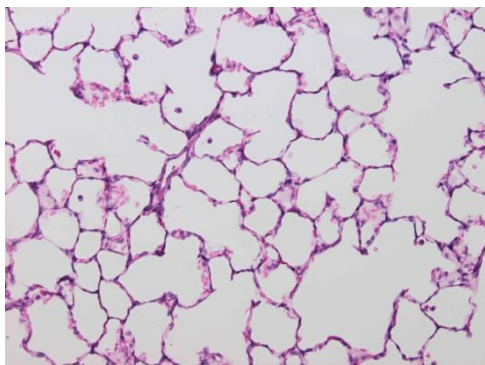


Los valores son media \pm DE. MH, membranas hialinas.

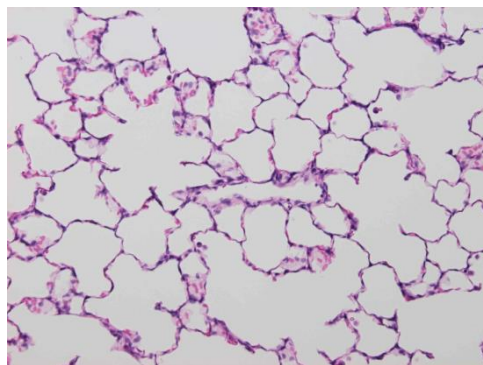
* $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH;

$p < 0.05$ vs. V_T Bajo + DDS

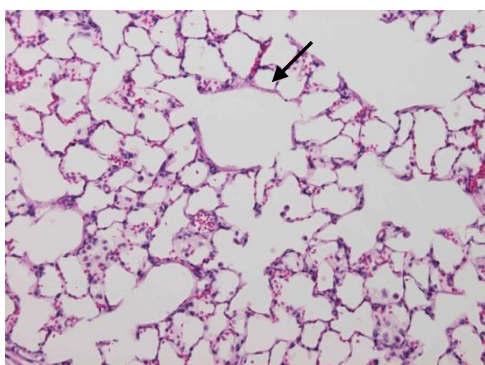
Figura 10. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento de la DDS sobre el parénquima pulmonar.



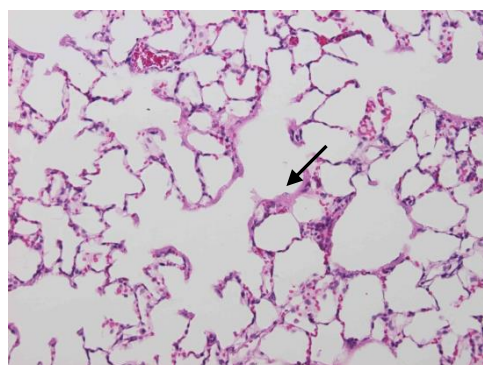
V_T Bajo + VEH



V_T Bajo + DDS



V_T Alto + VEH



V_T Alto + DDS

Panel superior (V_T Bajo): alveolos de apariencia normal, con septos alveolocapilares delgados, que separan la sangre del espacio alveolar e incluyen las células endoteliales, membrana basal y células epiteliales.

Panel inferior (V_T Alto): pulmón con VILI (la mebrana basal del alveolo está recubierta por el material resultante de la destrucción de los neumocitos tipo I y que constituyen las membranas hialinas

Efectos sobre otros órganos (Tabla 8)

Se determinó al final del experimento la concentración sérica de glucosa y creatinina, así como la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH), creatinina kinasa (CK), aspartato aminotransferasa (GOT), y alanina aminotransferasa (GTP).

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación de V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció con una mayor concentración sérica de glucosa y de la actividad sérica de LDH, CK, GOT y GTP (que alcanzaron significación estadística sólo en el caso de la actividad de CK y de GOT).

Efecto de la DDS

La administración de DDS no se asoció con ningún cambio en las variables bioquímicas analizadas.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

La aplicación de V_T elevado (en ratas tratadas con DDS) se asoció (de forma semejante+ a los cambios observados en animales no tratados con DDS) con una mayor concentración sérica de glucosa y de la actividad sérica LDH, CK, GPT, así como (no alcanzando la significación estadística) GOT.

En resumen,

(a) La aplicación de V_T elevado se asocia con signos de daño celular sistémico no específico de tejido (elevación de enzimas intracelulares).

(b) El tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica en los signos de daño celular sistémico.

Tabla 8. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre otros órganos

	Tratamiento	V _T Bajo	V _T Alto
Glucosa (mg/dL)	VEH	109±5,1	119±7,6
	DDS	101,±3,5	129,7±6 #
Creatinina (µg/dL)	VEH	0,6±0,02	0,6±0,10
	DDS	0,7±0,10	0,5±0,04
LDH (IU/L)	VEH	320±31	698±117
	DDS	401±51	846±212 #
CK (IU/L)	VEH	597±91	2042±511 *
	DDS	879±21	2196±31 #
GOT (IU/L)	VEH	83±4,60	145±19,50 *
	DDS	95±80	138±17
GTP (IU/L)	VEH	33±1,9	50±7,2
	DDS	35±2,2	50,4±5,4 #

Los valores son media ± DE

LDH, lactato aminotransferasa. CK, creatinín-kinasa. GOT, aspartato aminotransferasa. GTP, alanino aminotransferasa

Efectos de la DDS sobre la inflamación y apoptosis en el tejido pulmonar

A continuación, nos propusimos a analizar el efecto de la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la respuesta inflamatoria y sobre la apoptosis en tejido pulmonar.

Concentración de citoquinas y quimioquinas en el tejido pulmonar (Fig.11)

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación de V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció con una mayor concentración de TNF-α, IL-6, MIP-2, MCP-1 y (no alcanzando la significación estadística) IL-1β, en comparación con la administración de V_T Bajo.

Efecto de la DDS

En ratas tratadas con DDS la concentración en tejido pulmonar de TNF- α , MIP-2, MCP-1 tendió a ser mayor que en ratas no tratadas con DDS, sin alcanzar la significación estadística.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

La administración de V_T elevado, en comparación con V_T bajo, se asoció en ratas tratadas con DDS con un aumento no significativo en la concentración TNF- α , IL-6, MCP-1. Este hallazgo contrasta con los cambios significativos en la concentración de las mismas citoquinas en ratas no tratadas con DDS.

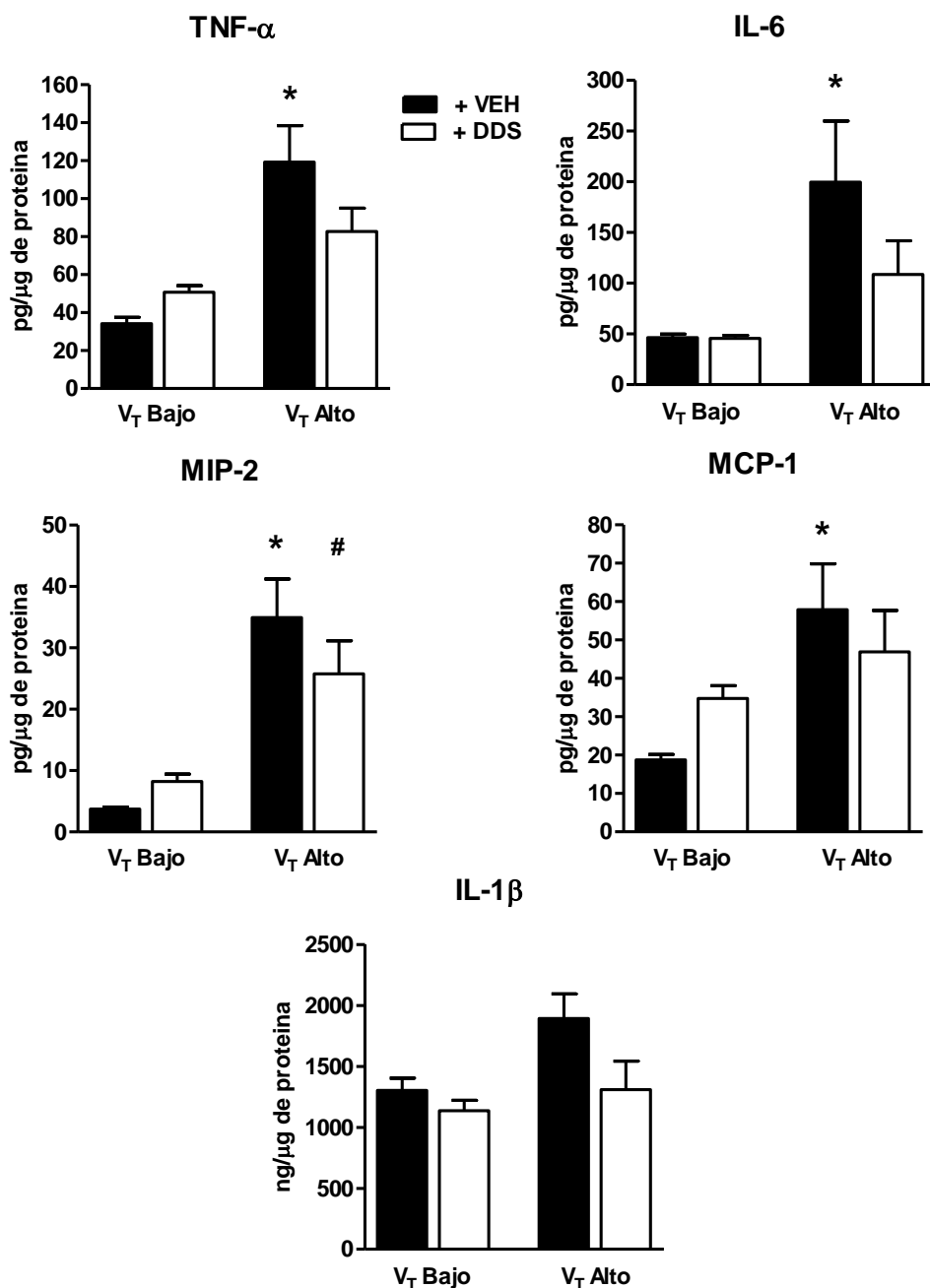
Sin embargo (a semejanza a los cambios encontrados en ratas no tratadas con DDS), las ratas tratadas con DDS presentaron una elevación estadísticamente significativa de MIP-2, sin cambios en la concentración de IL-1 β , en los animales que recibieron V_T elevado en comparación con los que recibieron V_T Bajo.

En resumen:

(a) La aplicación de V_T elevado se asocia con una respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar (mayor concentración de TNF- α , IL-6, MIP-2, y MCP-1).

(b) El tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar asociada a la ventilación mecánica (V_T elevado) (menor elevación de TNF- α , IL-6, MCP-1).

Figura 11. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y de quimioquinas en tejido pulmonar



Todos los parámetros fueron medidos al final del período de ventilación mecánica. Los valores son media ± DE.

*p<0.05 vs. V_T Bajo + VEH

#p<0.05 vs. V_T Bajo + DD

Expresión de genes en tejido pulmonar (Fig.12)

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación de V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció con una mayor expresión de los genes *TNF- α* , *IL-6*, *MIP-2* y *MCP-1* en comparación con la administración de V_T bajo, y una menor expresión de *CXCR2*.

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS no indujo cambios en la expresión de los genes analizados, excepto una menor expresión de *MCP-1*.

Efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

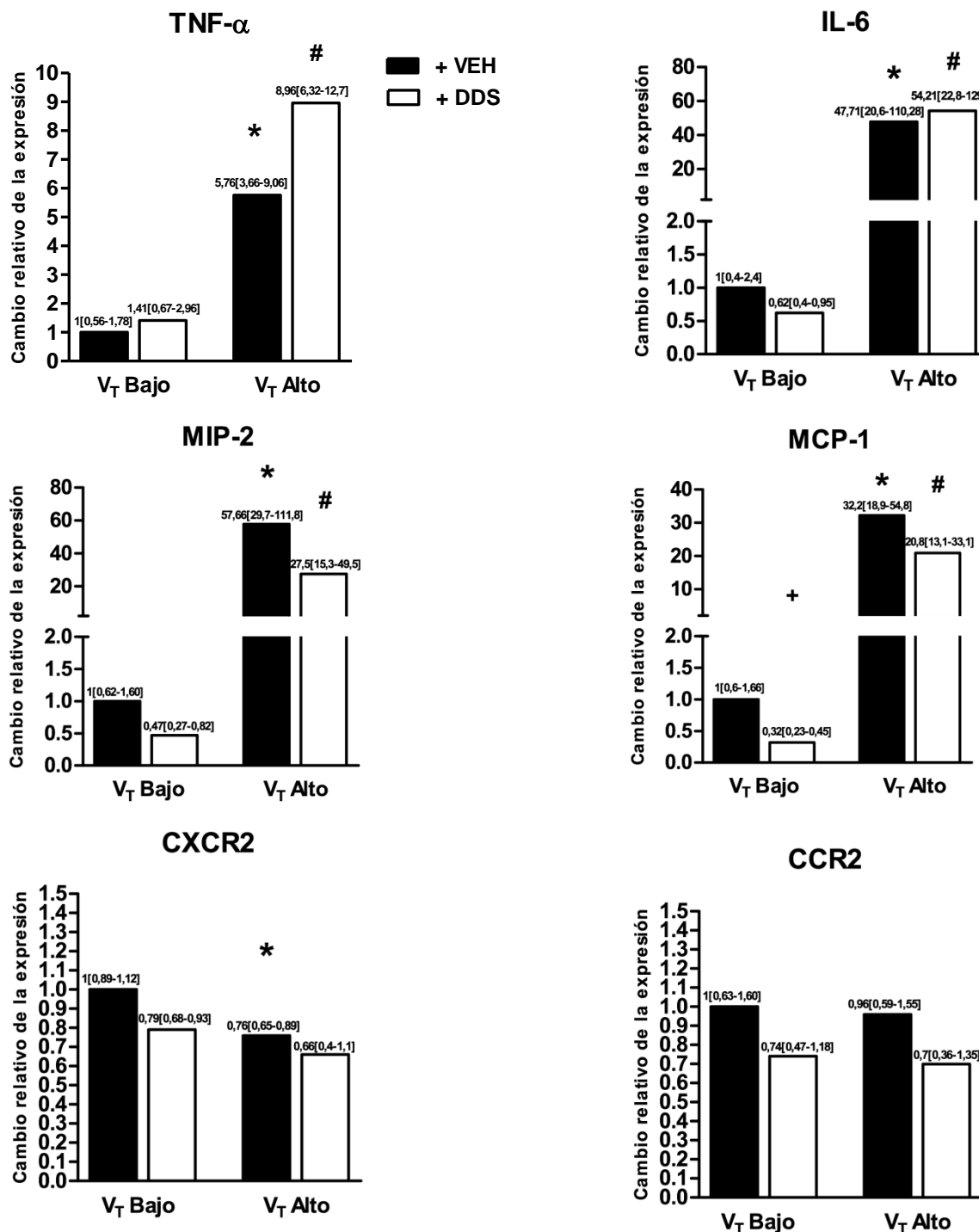
En animales tratados con DDS, la aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor expresión de los genes *TNF- α* , *IL-6*, *MIP-2* y *MCP-1* en comparación con la administración de V_T bajo, y (no alcanzando la significación estadística) una menor expresión de *CXCR2*. Estos cambios son semejantes a los observados en los animales no tratados con DDS.

En resumen,

*(a) La aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria (*TNF- α* , *IL-6*, *MIP-2* y *MCP-1*).*

*(b) El tratamiento con DDS se asocia con una disminución de la inmunidad en algunos aspectos (e.g., menor expresión génica de *MCP-1*).*

Figura 12. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la expresión de genes de citoquinas, quimioquinas y sus receptores en el tejido pulmonar



Todos los parámetros fueron medidos al final del período de ventilación mecánica. Los valores son valores normalizados respecto a la expresión génica en el grupo sometido a V_T Bajo y sin tratamiento con DDS, indicando el intervalo de confianza del 95%. *p<0.05 vs V_T Bajo + VEH; #p<0.05 vs V_T Bajo + DDS; +p<0.05 vs V_T Bajo + VEH

Concentración de TLR-4 en el tejido pulmonar (Fig. 13)

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación de V_T Bajo se asoció con una mayor expresión de TLR-4 en comparación con un grupo no ventilado.

La aplicación del V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció con una menor expresión de TLR-4 en comparación con la administración de V_T Bajo.

Efecto de la DDS

La administración de DDS en animales sometidos a VT Bajo no cambió la expresión de TLR-4 (en comparación con animales no tratados con DDS).

Efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la VM

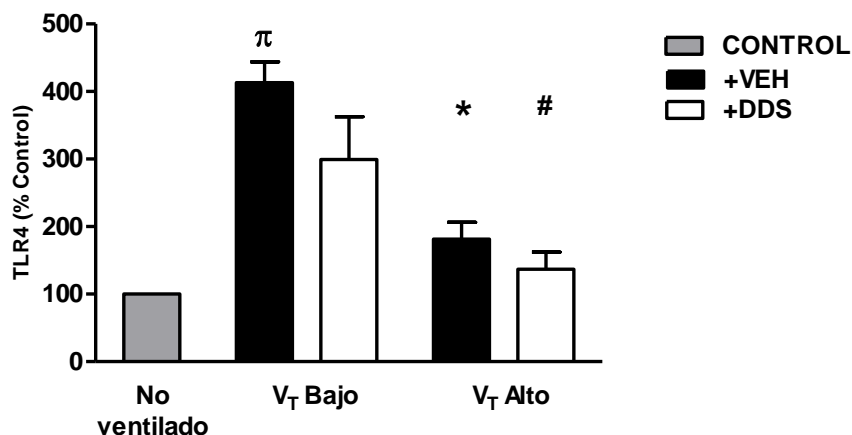
La aplicación del V_T elevado (en ratas tratadas con DDS) se asoció con una menor expresión de TLR-4 en comparación con la administración de V_T Bajo (disminución también observada en los animales no tratados con DDS al recibir VT elevado en comparación con VT Bajo).

En los animales sometidos a VT elevado, la expresión de TLR-4 fue similar en el grupo tratado con DDS que en el grupo no tratado.

En resumen,

- (a) La aplicación de V_T elevado se asocia con una menor expresión de TLR-4 en comparación con la aplicación de V_T Bajo.
- (b) El tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica en la expresión de TLR-4 en el tejido pulmonar.

Figura 13. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la concentración de TLR-4 en tejido pulmonar (Western blot)



Todos los parámetros fueron medidos al final del período de ventilación mecánica. Los valores son media ± DE

*p<0.05 vs. V_TBajo + VEH

#p<0.05 vs V_T Bajo + DDS

πp<0.05 vs CONTROL

Cambios en la apoptosis (Fig.14 y 15)

Para determinar el grado de apoptosis se cuantificó el número de células positivas para TUNEL en cortes de tejido pulmonar (ver Métodos).

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación de V_T elevado, en comparación con VT bajo, aumentó significativamente el grado de apoptosis.

Efecto de la DDS sobre la VM

La administración de DDS no se asoció con cambios en el grado de apoptosis.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

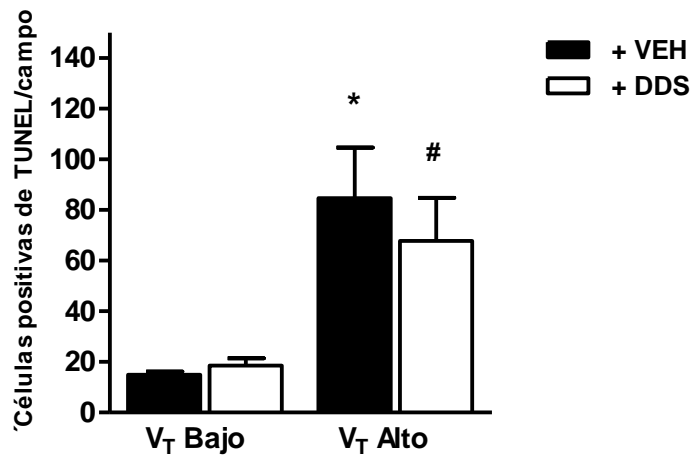
El tratamiento con DDS no se asoció con un efecto sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica en el grado de apoptosis.

En resumen;

(a) La aplicación de V_T elevado indujo un aumento en el grado de apoptosis en el tejido pulmonar.

(b) El tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica en el grado de apoptosis en el tejido pulmonar.

Figura 14. Cuantificación de apoptosis en las secciones de tejido pulmonar

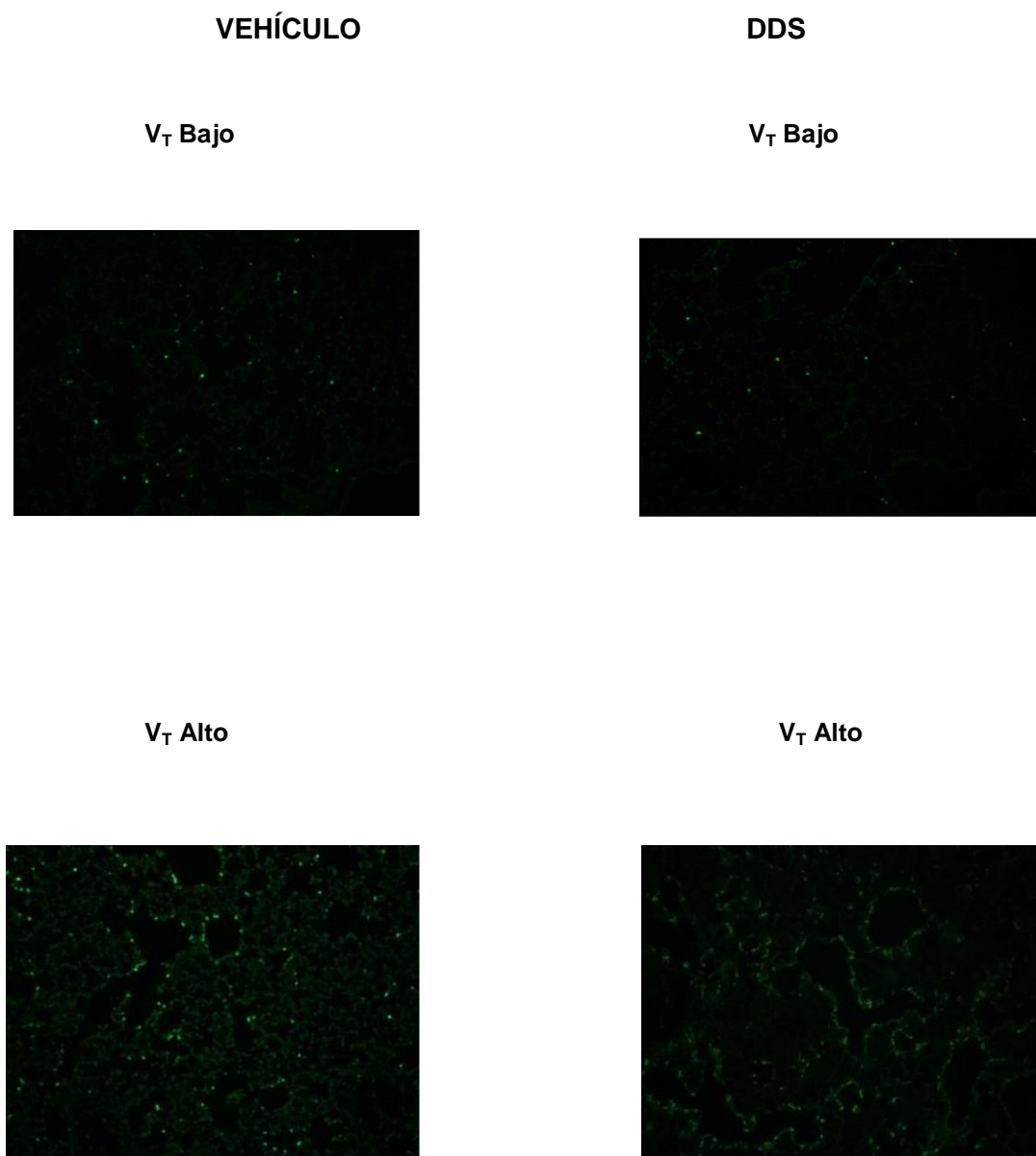


Los valores son media \pm DE

* $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH

$p < 0.05$ vs. V_T Bajo + DDS

Figura 15. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la apoptosis en tejido pulmonar (TUNEL)



Reacción TUNEL (terminal desoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labelling) de secciones representativas de cortes de pulmón que corresponden a ratas sometidas a ventilación mecánica durante 2,5 horas previamente tratadas o no tratadas con DDS. Los núcleos de muchas células del parénquima pulmonar muestran signos de apoptosis lo cual se traduce en una reacción positiva para TUNEL y son visualizados como puntos verdes (aumento x200).

Efecto de la DDS sobre la inflamación del tejido intestinal (Fig.16)

Concentración de citoquinas y quimioquinas en el tejido intestinal

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación del V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció, en comparación con la aplicación de V_T Bajo, con una menor concentración de MIP-2, mientras que no se observó ningún cambio en otras citoquinas estudiadas.

Efecto de la DDS

Los animales que recibieron DDS presentaron, en comparación con los que no recibieron DDS, una menor concentración de MIP-2 y una mayor concentración de IL-6. Otras citoquinas y quimioquinas determinadas presentaron una concentración similar en animales tratados con DDS y en animales no tratados con DDS.

Efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

Entre los animales tratados con DDS, la administración de V_T elevado (en comparación con V_T Bajo) no se asoció con ningún cambio en las citoquinas determinadas (mientras que la aplicación de V_T elevado en ratas no tratadas con DDS se asoció con una menor concentración de MIP-2).

En los animales que reciben V_T elevado, la mayor concentración de IL-6 y la menor concentración de MIP-2 en animales tratados con DDS en comparación con los no tratados con DDS ha de ser interpretado con cautela, puesto que esta diferencia (entre tratados y no tratados con DDS) ya está presente en los animales que reciben V_T Bajo. Por tanto, el efecto de la DDS sobre IL-6 y MIP-2 se debe más probablemente a un cambio en la situación basal relacionado con la administración de DDS, y no a una modulación por la DDS del efecto de la ventilación mecánica sobre IL-6 y MIP-2.

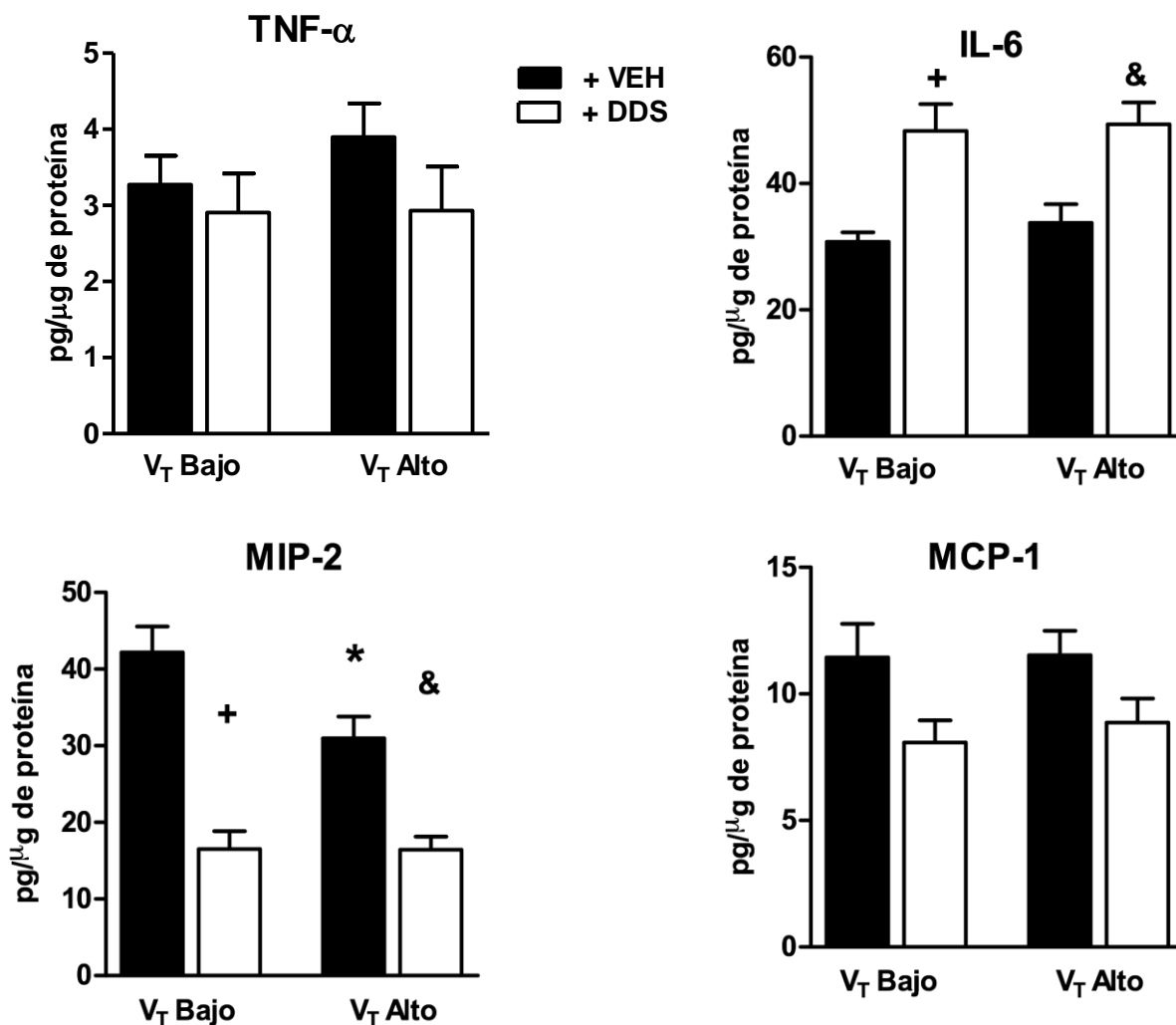
En resumen,

(a) La aplicación de V_T elevado se asocia con una menor concentración de MIP-2, lo cual puede interpretarse como una respuesta anti-inflamatoria en el tejido intestinal inducida por la ventilación mecánica.

(b) El tratamiento con DDS se asocia con una disminución de la concentración de MIP-2 y un aumento de la concentración de IL-6, lo cual puede interpretarse como una respuesta anti-inflamatoria en el tejido intestinal inducida por el tratamiento con DDS.

(c) Nuestros resultados no indican que la respuesta inflamatoria intestinal a la ventilación mecánica se encuentre modulada por el tratamiento con DDS.

Figura 16: Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la concentración de citoquinas y quimioquinas en el tejido intestinal



Todos los parámetros fueron medidos al final del período de ventilación mecánica. Los valores son media ± DE.

*p<0.05 vs. V_T Bajo + VEH

#p<0.05 vs. V_T Bajo + DDS

+p<0.05 vs. V_T Bajo + VEH

6p<0.05 vs. V_T Alto + VEH

Expresión de genes en el tejido intestinal (Fig. 17)

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación de V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció con una menor expresión del gen de MIP-2 y su receptor CXCR2, así como (no significativamente) de IL-6, en comparación con la administración de V_T Bajo.

La expresión de otros genes analizados no se modificó por la ventilación mecánica.

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS se asoció con una menor expresión de IL-6, MIP-2 y su receptor CXCR2. No se encontraron cambios en la expresión de otros genes analizados.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

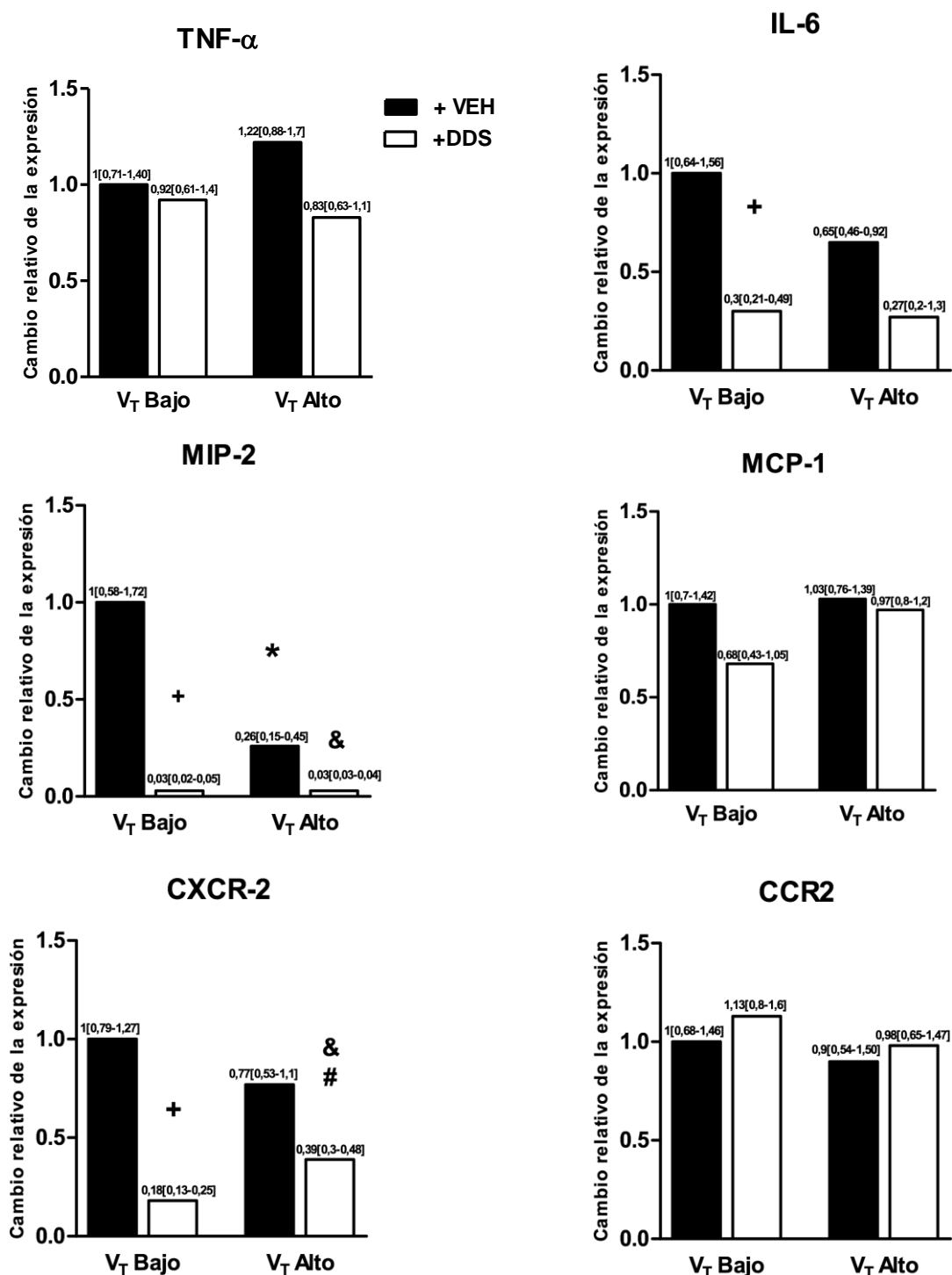
En animales tratados con DDS, la aplicación de V_T elevado (en comparación con V_T Bajo) no se asoció con ningún cambio en la expresión génica (mientras que en animales no tratados con DDS la expresión de MIP-2 y de CXCR2 disminuyó).

Adicionalmente, en animales sometidos a VT elevado la expresión génica de MIP-2 y de CXCR2 fue menor en los tratados con DDS que en los no tratados con DDS.

En resumen,

- (a) la aplicación de V_T elevado se asocia con una respuesta antiinflamatoria (menor expresión del gen de MIP-2 y CXCR2);*
- (b) el tratamiento con DDS se asocia con un efecto antiinflamatorio (disminución de la expresión de los genes de IL-6, MIP-2, CXCR-2);*
- (c) el tratamiento con DDS atenúa la respuesta inducidos por la VM- con VT elevado (menor elevación de MIP-2 y CXCR2 en animales **sometidos a VT elevado**).*

Figura 17. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la expresión de genes de citoquinas, quimioquinas y sus receptores en tejido intestinal



Todos los parámetros fueron medidos al final del período de ventilación mecánica. Los valores son valores normalizados respecto a la expresión génica en el grupo sometido a V_T Bajo y sin tratamiento con DDS, indicando el intervalo de confianza del 95%

* $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH; # $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + DDS; + $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH; & $p < 0.05$ vs. V_T elevado + VEH

Efecto de la DDS sobre la respuesta inflamatoria sistémica (Fig. 18)

Concentración de citoquinas en suero

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación del V_T elevado, en comparación con V_T Bajo (en ratas no tratadas con DDS), se asoció con un aumento significativo de la concentración sérica de MIP-2, sin apreciarse cambios en las otras citoquinas analizadas.

Efecto de la DDS

El tratamiento con DDS se asoció con una disminución de la concentración de TNF- α y IL-6.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

Los animales tratados con DDS presentaron al administrar un V_T elevado (en comparación con V_T Bajo) una elevación de la concentración sérica de IL-6 (este cambio contrasta con los hallazgos observados en los animales no tratados con DDS, en los cuales se observó un aumento de MIP-2).

La concentración sérica de las citoquinas estudiadas (excepto la IL-6) no presentó cambios al aplicar V_T elevado (en comparación con V_T Bajo) en animales tratados con DDS, mientras que los animales no tratados con DDS mostraron un aumento significativo de MIP-2 al administrar V_T elevado.

En los animales sometidos a V_T elevado, la concentración de TNF- α y IL-6 fue menor en los tratados con DDS que en los no tratados con DDS.

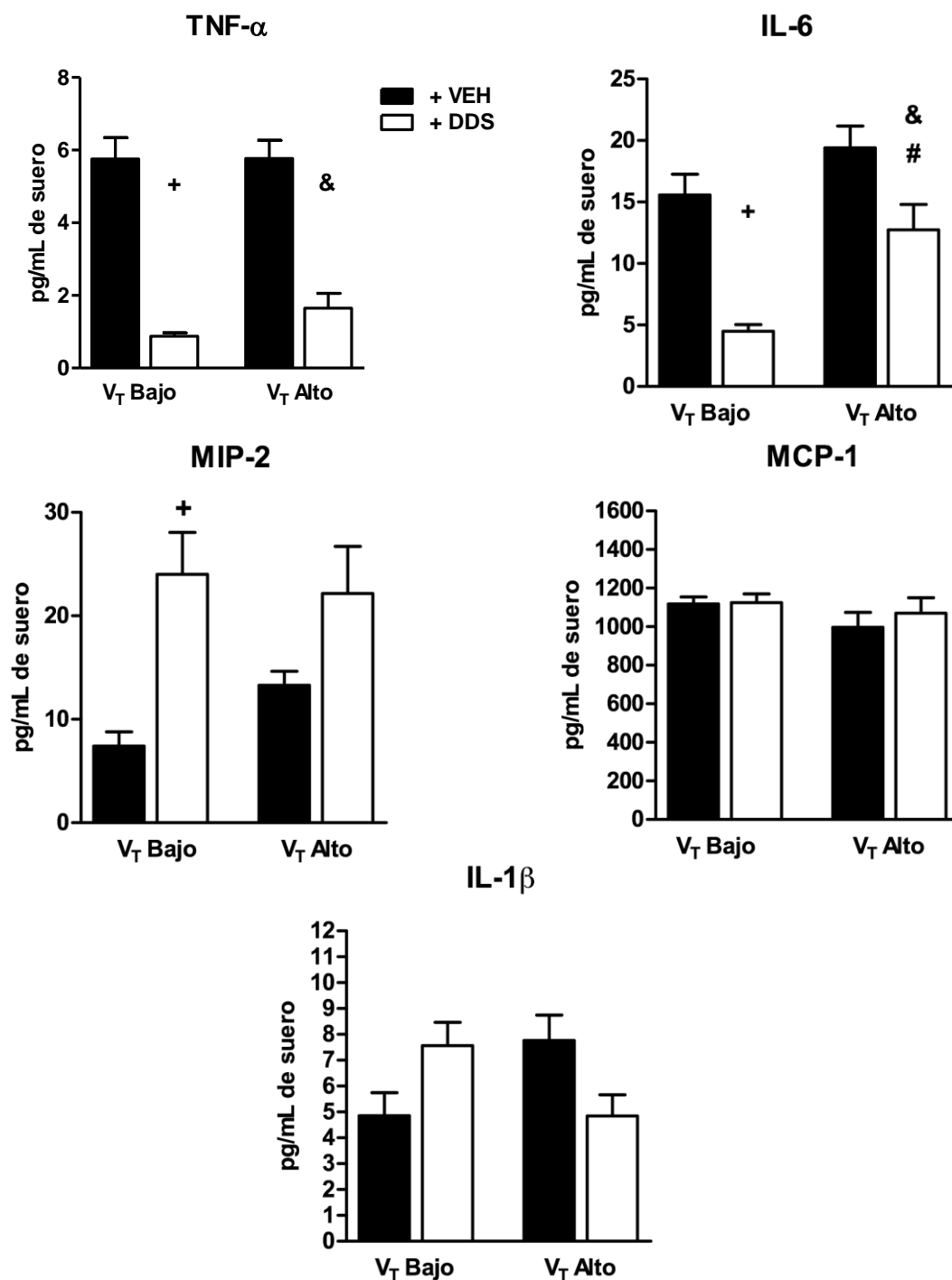
En resumen,

(a) La aplicación de V_T elevado aumenta, en comparación con V_T Bajo, la concentración sérica de MIP-2.

(b) El tratamiento con DDS se asocia con cambios anti-inflamatorios (disminución de TNF- α e IL-6).

(c) El tratamiento con DDS bloquea los efectos pro-inflamatorios inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado (menor concentración de TNF- α y IL-6 en animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado en animales tratados con DDS).

Figura 18. Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la concentración de citoquinas en el suero



Todos los parámetros fueron medidos al final del período de ventilación mecánica. Los valores son media \pm DE.

* $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH

$p < 0.05$ vs. V_T Bajo + DDS

+ $p < 0.05$ vs. V_T Bajo + VEH

& $p < 0.05$ vs. V_T Alto + VEH

Efecto de la ventilación mecánica y del tratamiento con DDS sobre la concentración de LPS en el plasma (Fig. 19)

Efecto de la ventilación mecánica

La aplicación de V_T elevado no indujo cambios en los niveles de LPS en comparación con la aplicación de V_T bajo.

Efecto de la DDS

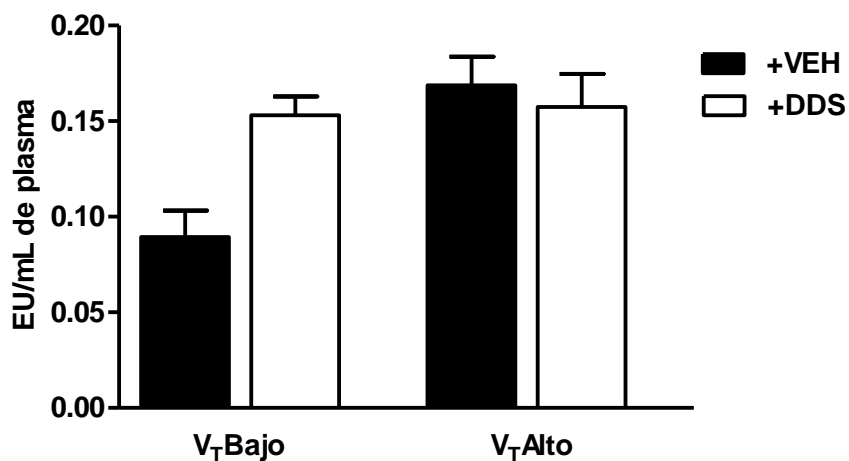
El tratamiento con DDS no se asoció con cambios en la concentración de LPS en el plasma.

Efecto de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

El tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica en los niveles de LPS en el plasma.

En resumen, la concentración de LPS en plasma no se modificó por la ventilación mecánica ni por el tratamiento con DDS.

Figura 19. Concentración de LPS en plasma



Todos los parámetros fueron medidos al final del período de ventilación mecánica.

Los valores son media \pm DE

6. Discusión

Discusión del objetivo 1: Efecto de la ventilación mecánica con V_T alto

El principal objetivo del presente estudio es demostrar que el tratamiento con DDS modula la respuesta pulmonar al insulto causado por la ventilación mecánica (i.e., VILI). Para alcanzar este objetivo hemos utilizado un modelo establecido de VILI previamente desarrollado por nuestro laboratorio [49, 224, 229-233]

El objetivo 1 fue planteado en este estudio para documentar que, en efecto, el insulto en estudio (i.e; la ventilación mecánica utilizando un V_T elevado) reproduce los cambios deseados sobre el pulmón, el sistema cardiovascular y sobre otros órganos, tanto en aspectos relacionados con la estructura y la función como con la respuesta inflamatoria.

El objetivo 1 es contestar a las preguntas *¿Es válido nuestro modelo de VILI? ¿Se asocia a los cambios deseados, tanto en la función y estructura del pulmón, como en la función de otros órganos (i.e; cardiovascular)? ¿Se acompaña de cambios inflamatorios en el tejido pulmonar? ¿Se puede demostrar una respuesta inflamatoria en el tejido intestinal?*

Los objetivos 1.1 a 1.4 hacen referencia a la mecánica respiratoria, la función pulmonar y cardiovascular y la afectación de otros órganos (valorada de forma inespecífica mediante la determinación de la actividad de enzimas intracelulares ubicuos en el organismo, como la CK, SGOT, etc.).

Los objetivos 1.5 a 1.7 hacen específicamente referencia a la respuesta inflamatoria: pulmonar; “sistémica”, es decir, valorada mediante determinaciones en el suero; e intestinal.

El modelo animal

Nuestro modelo consiste en la aplicación de un V_T de 25ml/kg y PEEP=0 cmH₂O. Se trata de un modelo establecido con cuyo estudio hemos realizado investigaciones previas [49, 224, 229-233] Previamente utilizamos en nuestro laboratorio un V_T más elevado ($V_T=35$ ml/kg), que se encuentra en el rango utilizado por otros estudios (entre 20ml/kg y 42ml/kg para las ratas) [234]. Se puede argumentar que estos valores se encuentran fuera del rango de V_T generalmente utilizado en pacientes, ya que en la práctica clínica no se utilizan valores superiores a 10ml/kg. Sin embargo la relevancia clínica del modelo animal de VILI no radica necesariamente en el valor concreto de V_T utilizado, sino en la inducción mediante biotrauma de daño pulmonar y una respuesta pulmonar y sistémica. El modelo animal de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica intenta reproducir de una forma exagerada los hallazgos que posiblemente se presenten en pacientes, con el objetivo de analizar sus mecanismos y eventualmente diseñar estrategias preventivas y terapéuticas. Por otro lado la inducción de este daño en ratas exige la utilización de un V_T más elevado del generalmente utilizado en pacientes.

La estrategia ventilatoria elegida para ventilar al grupo control fue la aplicación de $V_T=9\text{ml/kg}$ y $\text{PEEP}=+5\text{ cm H}_2\text{O}$. Este V_T (9ml/kg) no se asocia con sobredistensión significativa. Se puede argumentar que el uso de V_T bajos en ratas, aun cuando se aproximen al valor de 6ml/kg (que es el recomendado para la ventilación mecánica en pacientes) se asocia a un cierto grado de inflamación. En efecto, diferentes estudios han demostrado que se puede detectar un aumento del grado de inflamación tisular en pulmones sometidos a V_T bajos en comparación con pulmones no ventilados. Por tanto, evitar la inducción a cualquier grado de inflamación tisular no se posible aún cuando se utilicen V_T muy bajos, ya que el hecho de utilizar ventilación con presión positiva siempre origina cierto grado, aunque más leve cuanto menor sea el V_T , de inflamación pulmonar.

Parte de la estrategia ventilatoria consistió en el uso de un bajo nivel de PEEP. Estudios realizados por Weeb y Tierney [1] demostraron el efecto protector de la aplicación de un nivel bajo de PEEP. Estudios posteriores demostraron que la reducción del volúmen corriente, manteniendo los mismos niveles de PEEP, reduce significativamente el daño epitelial y endotelial y atenúa los cambios histológicos [235]. El efecto protector de niveles bajos de PEEP también ha sido sugerido por estudios en pacientes [236, 237].

En una reciente conferencia consenso [238], se consensuó, utilizando el método Delphi, los criterios exigidos en un modelo de DPA, dentro del cual se incluye el DPA causado específicamente por ventilación mecánica con V_T elevado (VILI), objeto del presente estudio. Se aceptó que los modelos han de tener al menos 3 de las 4 siguientes características: evidencia histológica del daño tisular, alteración de la membrana alveolocapilar, presencia de respuesta inflamatoria y evidencia de disfunción fisiológica. Como se discute en detalle en el presente apartado, nuestro modelo reúne las características acordadas que ha de desarrollar un modelo de DPA en general.

El fenotipo que se pretende reproducir en el modelo animal de VILI e caracteriza por cambios indicativos en general por inflamación pulmonar, que se traducen en empeoramiento de las propiedades mecánicas del pulmón, alteración del intercambio gaseoso, aumento de la permeabilidad alveolocapilar, formación de edema pulmonar, y cambios estructurales (en microscopía óptica) indicativos de daño alveolar difuso (DAD). Los cambios histológicos no revelan sino una respuesta inflamatoria pulmonar (infiltración de neutrófilos polinucleares, engrosamiento de la membrana alveolocapilar, hemorragia alveolar, y formación de membranas hialinas).

Estos cambios en la estructura y función pulmonares se acompañan de una respuesta inflamatoria caracterizada por un aumento de la concentración de citoquinas proinflamatorias y de la respuesta génica correspondiente.

Los cambios en la estructura y función colectivamente indican *daño* pulmonar. Los únicos cambios indicativos de *disfunción* pulmonar son la hiperpermeabilidad alveolocapilar y el deterioro del intercambio gaseoso, si se considera, como se argumentable, que la *función* del pulmón como órgano en la economía consiste en mantener una permeabilidad alveolocapilar normal (para evitar la formación de edema intersticial y alveolar) y permitir el intercambio gaseoso.

El daño pulmonar en el contexto de la ventilación mecánica se acompaña, como han documentado varios estudios de manifestaciones sistémicas, incluyendo hipotensión (presumiblemente de origen inflamatorio, es decir no causada por cambios en la precarga secundarios a oscilaciones cíclicas en la presión intratorácica) y cambios en otros órganos (intestino, riñón) [49, 150, 224]

Estructura y función pulmonares: Características mecánicas

En lo referente a los resultados discutidos en la presente sección, nuestro modelo reproduce los cambios característicos del VILI. La distensibilidad del sistema torácico (C_{DYN}) disminuyó a largo del tiempo de observación. El grupo sometido a V_T elevado mostró un aumento progresivo de

la presión pico (PIP) y de la resistencia de la vía aérea (R_{VA}) de aproximadamente un 35% y un 42%, respectivamente, en relación al valor basal, y una disminución de la distensibilidad (C_{DYN}) de un 26%.

Se puede argumentar que los cambios en la distensibilidad del sistema torácico no reflejan necesariamente cambios en la distensibilidad estática pulmonar, sino que pueden reflejar cambios en la R_{VA} . En efecto, la resistencia de la vía aérea aumentó significativamente en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado. Sin embargo, al menos en el grupo tratado con DDS, la distensibilidad dinámica disminuyó al final del experimento, mientras que no se observaron cambios paralelos en la R_{VA} , sugiriendo, por tanto, que los cambios en C_{DYN} no se deben a cambios en R_{VA} sino a cambios en la presión *plateau* (no medida) y por tanto reflejan cambios en la distensibilidad estática pulmonar.

Los cambios observados se encuentran en línea con los hallazgos reportados en la literatura sobre investigación en modelos animales de VILI. En diferentes estudios [6, 229, 239-241] se han descrito tras la administración de un V_T elevado los cambios observados en nuestro modelo en la PIP, R_{VA} y C_{DYN} . Por ejemplo Tremblay y cols en un modelo de lesión pulmonar (en ratas) con volumen elevado ($V_T=15\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ / $V_T=40\text{ml}/\text{kg}^{-1}$ y PEEP=0) la complianza estática disminuye a lo largo de los 150 minutos de la VM [6]. Nin y cols ventilando ratas con $V_T=35\text{ml}/\text{kg}$ y PEEP=0 en relación al grupo control mostró un aumento de la PIP y una disminución de la compliance en el periodo de 75 min de la VM [229]. Hegeman y cols [240] usando $V_T=15\text{ml}/\text{kg}$ y PEEP=0, en ratones la complianza estática disminuyó a lo largo del periodo de VM (5 a 12 horas). Niitsu y cols [241] ventilan ratas empleando PIP=21mmHg y PEEP=0 durante 90 minutos, observa mejoría de las complianza estática al pretatar a los animales con un inhibidor no selectivo de la COX.

En es contexto del presente modelo, los cambios de la mecánica del sistema torácico pueden indicar cambios estructurales pulmonares (i.e; desarrollo de fibrosis), cuyo desarrollo no es plausible en el esquema temporal del experimento, o bien desarrollo del edema pulmonar. Aun cuando nosotros no hemos medido específicamente ninguna variable directamente indicativa de la formación de edema pulmonar (e.g; ratio peso seco/peso húmedo), la disminución de la distensibilidad del sistema torácico es fuertemente consistente con el desarrollo del edema pulmonar.

La conclusión más probable es, pues, que como consecuencia de la ventilación mecánica utilizando V_T elevado se desarrolle inflamación y edema pulmonares, como se ha documentado previamente [242, 243]. Esta conclusión está apoyada también por la observación visual muy clara y evidente (aunque no cuantificada) de edema pulmonar apreciado por el experimentador en el momento de la extracción de los tejidos al final del experimento. Asimismo, los cambios en la concentración de proteínas y de IgM en el fluido del LBA (*vide infra*) apoyan la hipótesis de desarrollo de hiperpermeabilidad alveolocapilar y formación de edema pulmonar como consecuencia de la ventilación mecánica con V_T elevado.

Intercambio gaseoso

Asimismo, en el modelo utilizado en la presente investigación se observaron cambios consistentes con disfunción pulmonar, como son el aumento de la permeabilidad alveolocapilar y el deterioro del intercambio gaseoso.

Aun cuando la disminución de la $PaCO_2$ desde el comienzo hasta el final (tras 2,5 horas) del período de ventilación mecánica no alcanzó la significación estadística en el presente estudio, es posible que este hallazgo negativo se explique por un error tipo II. En efecto, en el grupo tratado con DDS, el cambio alcanzó la significación estadística, lo cual si se atribuye al tratamiento con DDS no tiene ninguna plausibilidad biológica en el contexto de la constelación de cambios asociados a la ventilación mecánica con V_T elevado y al tratamiento con DDS reportados en la presente memoria. Los cambios de la PO_2 en los diferentes grupos se explican mejor por un efecto significativo de la ventilación mecánica con V_T elevado sobre el intercambio gaseoso. Por otro lado, trabajos previos de nuestro grupo utilizando el mismo modelo han descrito cambios significativos en la PaO_2 [223, 224, 229, 230, 244]. Nuestros hallazgos respecto al deterioro del intercambio gaseoso tras la administración de V_T elevado están en consonancia con hallazgos paralelos observados en modelos similares de VILI.

Permeabilidad alveolocapilar

El aumento detectado en los animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado (en comparación con los animales sometidos a ventilación mecánica con V_T bajo) de la *ratio* de la concentración de proteínas en el fluido de LBA y la concentración de proteínas en suero es demostrativa de un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar, cambio fisiopatológico subyacente en la formación de edema (Fig. 7, 8 y 9).

Se podría argumentar que el aumento de la concentración de proteínas en el fluido de LBA se debe a la presencia de células en el espacio alveolar. Por esta razón, también se midió la concentración de IgM en el fluido de LBA, molécula que sólo puede proceder de la sangre y cuya presencia en el fluido del LBA indica aumento de la permeabilidad alveolo-capilar. En efecto, se detectó un aumento de la concentración de Ig M en el fluido del LBA demostrativo de un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar.

El aumento de la permeabilidad alveolocapilar fue muy marcado, resultando un hallazgo de gran relevancia para la documentación del modelo. En efecto, la demostración de disfunción pulmonar no resulta fácil, ya que sólo el mantenimiento de la permeabilidad alveolocapilar y de los intercambios gaseosos normales pueden considerarse elementos característicos de la *función* pulmonar. Otros cambios reportados (e.g; en la concentración de citoquinas, expresión génica, etc.) indican *daño* del órgano pero no necesariamente *disfunción*. El aumento de la permeabilidad alveolocapilar representa un elemento fisiopatológico fundamental para la documentación del modelo, ya que permite sustentar el desarrollo de edema pulmonar no hidrostático (i.e; por hiperpermeabilidad), característica esencial del VILI y del daño pulmonar agudo (DPA) en general.

Nuestros resultados sobre la hiperpermeabilidad asociada a la ventilación mecánica con V_T elevado están en consonancia con los resultados de otros grupos en modelo de VILI [149, 150, 230, 245-247]. Por ejemplo Wilson y cols [149] al evaluar el edema pulmonar encuentran un aumento en la concentración de proteínas totales en ratones ventilados con $V_T=43-44$ ml/kg y PEEP=0 durante 150 minutos. Wolthouis y cols [245] evalúan el edema pulmonar en un modelo de resucitación con fluidos CINA0.9%/Bicarbonato (para prevenir la acidosis metabólica) ventilan ratones con $V_T=7,5$ ml/kg/ $V_T=15$ ml/kg y PEEP=2cmH₂O durante 5 horas, encontraron un aumento de proteínas totales en LBA y un mayor ratio de peso seco/húmedo en los ratones sobreventilados. Por otro lado guery cols [150] demostraron que ventilando a las ratas durante 2 horas con dos estrategias ventilatorias ($V_T=30$ ml/kg, PEEP=9ml/kg y $V_T=10$ ml/kg, PEEP=2cmH₂O), en las ratas sobreventiladas se encontró una mayor concentración de TNF- α a nivel sistémico y esto se asociaba con hiperpermeabilidad, que se evaluó midiendo la concentración de albúmina marcada en el LBA (previamente se administró por vía i.v. albúmina humana marcada con I1259) . El pretratamiento con anticuerpos TNF- α a través por vía i.v. redujo el aumento de la permeabilidad alveolocapilar.

Cambios histológicos

En nuestro modelo se pudo demostrar la presencia de cambios histológicos consistentes con DAD (daño alveolar difuso), caracterizados fundamentalmente por la presencia de membranas hialinas en el exámen histológico de muestras de tejido pulmonar. Este hallazgo otorga particular relevancia clínica a nuestro modelo de VILI, puesto que el DAD es el sustrato histológico del SDRA.

Hay que señalar que la mayoría de los modelos de ALI (o, más concretamente, de VILI) reproducen una condición fisiopatológica inducida por la ventilación mecánica utilizando el V_T elevado caracterizado por un aumento de la inflamación pulmonar, edema pulmonar, e hiperpermeabilidad alveolocapilar, en combinación con cambios histológicos indicativos de inflamación tisular. Sin embargo con frecuencia los cambios histológicos no incluyen la formación de membranas hialinas. En efecto, otros estudios han descrito en el contexto de VILI alveolitis neutrofílica, infiltrado inflamatorio, edema, y otros cambios consistentes a DAD VILI [149, 150, 230, 245-247], pero el hallazgo específicamente de membranas hialinas no es frecuente. La presencia de membranas

hialinas añade un gran valor al presente modelo, pues asemeja con más exactitud los cambios histológicos reproducidos a los encontrados en humanos con la condición clínica. Por otro lado, la presencia de membranas hialinas, y no sólo la identificación de una respuesta inflamatoria, otorga al presente modelo una especial gravedad.

Cambios sistémicos

El daño pulmonar modelizado en el presente estudio y en otros previos [248-250] se acompaña de daño en otros órganos o sistemas. La documentación de estos cambios en órganos o sistemas diferentes al pulmón es de particular interés biológico y relevancia clínica, pues es conocido que con frecuencia los pacientes con daño pulmonar agudo presentan disfunción de otros órganos, que, de hecho, la causa más frecuente de muerte de estos pacientes con DPA/SDRA no está directamente relacionado con el pulmón (i.e; hipoxemia) sino con el desarrollo de shock y de síndrome de disfunción multiorgánica [122, 122, 251-253]

Varias explicaciones pueden dar cuenta del desarrollo de disfunción de órganos diferentes al pulmón en el contexto de VILI, y están en relación con el concepto de *descompartimentalización* de la respuesta inflamatoria. Los mediadores inflamatorios liberados en el parénquima pulmonar como consecuencia del insulto (VILI) no quedan retenidos en el espacio alveolar o en el intersticiopulmonar, sino que acceden a la circulación sistémica, como ha sido demostrado en diferentes estudios *in vivo* y *ex vivo* [254, 255]. Asimismo, se ha demostrado translocación de bacterias del espacio aéreo al compartimento sistémico en animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado a los que se ha instilado bacterias a través de la tráquea [256]. Este hallazgo podría representar otro mecanismo adicional para explicar la estimulación del sistema inmune innato durante el VILI. Se volverá a mencionar el concepto de *descompartimentalización* de la respuesta inflamatoria más adelante, cuando se aborde la discusión de los cambios en la respuesta inflamatoria asociados a la ventilación mecánica con V_T elevado y los efectos del tratamiento con DDS en esos cambios.

Hipotensión

Los cambios hemodinámicos (hipotensión progresiva) han sido objeto de estudios previos en nuestro laboratorio [223, 230, 244]. Se puede argumentar que la hipotensión observada no se trata de un efecto mediado por la inflamación generada por el pulmón dañado por la ventilación mecánica (tal como se pretende reproducir en el presente modelo), sino que es consecuencia de cambios hemodinámicos debidos a aumentos cíclicos de la presión intratorácica y a los consiguientes cambios en la precarga ventricular. Sin embargo, nuestros estudios sugieren fuertemente que los cambios observados en la presión arterial no se deben a cambios en la precarga cardíaca, sino que más bien se trata de cambios que se desarrollan en el contexto de una respuesta inflamatoria generada por el pulmón dañado por la ventilación mecánica [229].

También hemos demostrado en el presente modelo disfunción vascular *in vitro* caracterizada una disminución de la respuesta vasoconstrictora (a diferentes dosis de norepinefrina) y vasodilatadora dependiente del endotelio (a diferentes dosis de acetilcolina) en anillos vasculares procedentes de animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado. Estos resultados no se presentan en esta memoria, sino que han sido descritos previamente utilizando el mismo modelo de VILI [49, 223, 224]. Nuestros resultados son consistentes con un aumento inducido por la ventilación mecánica de la liberación de NO y de aniones superóxido. Encontramos que el tratamiento *in vitro* de los anillos vasculares procedentes de animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado. Este hallazgo proporciona evidencia indirecta de la implicación de un aumento de la formación de peroxinitrito (originado a partir de la reacción entre el radical superóxido y el NO) en la disfunción vascular asociada a la ventilación mecánica.

Determinaciones bioquímicas séricas (glucosa, LDH, CK, GOT, GPT)

El concepto de la descompartimentalización de la respuesta inflamatoria (i.e. la aparición en el circulatorio u otros órganos de mediadores inflamatorios procedentes del pulmón) explica los hallazgos de disfunción o daño de otros órganos diferentes del pulmón durante VILI. Este paradigma ha sido reproducido en nuestro modelo, en el cual hemos demostrado disfunción o daño en otros órganos diferentes del pulmón durante la aplicación de ventilación mecánica con V_T elevado.

En efecto, hemos demostrado en los animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado hipotensión arterial, así como elevación de la actividad sérica de GOT y CK y (de forma no significativa) de GPT y LDH y de la concentración sérica de glucosa.

Los cambios a los que se aluden en el presente apartado inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado (glucosa, LDH, CK, GOT y GPT) se observaron en ambos grupos (con y sin tratamiento con DDS). Algunos de estos cambios alcanzaron la significación estadística tanto en el grupo tratado como no tratado con DDS (CK); otros, sólo en el grupo no tratado con DDS (GOT), lo que va en consonancia con estudios previos [223, 229]; y finalmente, otros se observaron sólo en el grupo tratado con DDS (glucosa, LDH, GPT). En el contexto del amplio espectro de determinaciones realizadas en esta investigación, y en la interpretación global de estos efectos (ver al final de la discusión) pensamos que la significación de estos hallazgos en grupos tratados o no tratados con DDS, con valores que presentan una gran dispersión, no reflejan sino cambios que se producen en general en el contexto de la ventilación mecánica con V_T elevado, independientemente del tratamiento con DDS.

La hiperglucemia inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado indica posiblemente un fallo en el metabolismo energético. Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) en modelos animales [244, 257] apoyan el concepto de que el daño pulmonar agudo se asocia con alteraciones en el metabolismo energético. Serkova y cols [257] instilaron por vía intratraqueal citoquinas proinflamatorias y observaron mediante espectroscopía de resonancia magnética cambios en la concentración de ATP, ADP y glucosa, que indicaban afectación del

metabolismo energético en el contexto de DPA. Nosotros también hemos encontrado cambios en el tejido pulmonar mediante RMN en muestras de tejido pulmonar procedentes de animales sometidos a VILI que sugieren la misma conclusión.

La elevación significativa en los animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado (en comparación con V_T bajo) de la actividad sérica de LDH, CK, GOT y GTP indica daño celular inespecífico, ya que se trata de enzimas presentes de forma ubicua en numerosos tipos celulares. Si estos cambios indican disminución global del flujo sanguíneo sistémico, o bien indican más bien daño celular en el contexto de la inflamación sistémica asociada al VILI, no puede ser determinado con los resultados del presente estudio. Nuestros hallazgos en estudios previos demostrando atenuación de los cambios mencionados mediante el tratamiento con dexametasona sugieren, pero no demuestra, que se trata de cambios debidos a la respuesta inflamatoria asociada al biotrauma pulmonar.

En estudios relacionados con VILI en animales pequeños se ha desarrollado insuficiencia renal con aumento de la concentración sérica de creatinina [222, 230, 246]. Por ejemplo Imai y cols [222] producen VILI en conejos mediante aspiración de ácido clorhídrico seguido de 8 horas de ventilación mecánica (sobreventilados: $V_T=15-17\text{ml/kg}$ y $\text{PEEP}=0-3\text{ cmH}_2\text{O}$; Control: $V_T=5-7\text{ml/kg}$ y $\text{PEEP}=9-12\text{ cmH}_2\text{O}$ con reposición con lactato de Ringer 10ml/kg/h); A la octava hora encuentran un aumento de la concentración de creatinina en plasma de los conejos sobreventilados en relación con el grupo control.

Nin y cols [230], demostraron en ratas sépticas, elevación de la concentración sérica de creatinina tras 75 minutos de ventilación mecánica con $V_T=35\text{ml/kg}$ y $\text{PEEP}=0$ (durante la ventilación mecánica no hubo reposición con salino); la sepsis por punción ligadura cecal (*cecal ligadure puntion CLP*) fue inducida 48 horas antes de la ventilación mecánica.

Choi y cols [246] demostraron que la lesión microvascular causada por VILI es atenuada por la inhibición de la oxido nítrico sintasa endotelial. En este estudio se ventilaron a las ratas con ($V_T=7\text{ml/kg}$ o $V_T=20\text{ml/kg}$ y $\text{PEEP}=0\text{cmH}_2\text{O}$ (con y sin reposición de salino) durante 2 horas y se las dejó evolucionar 24 horas más en jaulas metabólicas. Ellos no encontraron diferencias significativas en la concentración de creatinina en suero, orina y en la fracción excretada de sodio. El grupo tratado con L-NAME (sobreventilado sin reposición con salino) reveló una menor concentración de creatinina en suero con respecto al grupo no tratado con L-NAME. Demostrando así que la sobreventilación y el L-NAME influyen en la función renal.

Nosotros no encontramos cambios en la concentración sérica de creatinina. Esta discrepancia puede ser debida a que en nuestro modelo se repuso volumen intravascular de forma constante por vía intravenosa en comparación a otros estudios [246]. Otra explicación plausible es que la elevación de la concentración sérica de creatinina puede requerir más tiempo del contemplado en nuestro modelo (2,5 horas), ya que en otros estudios la concentración sérica es evaluada 24 horas después del insulto ventilatorio [246].

Otras determinaciones en sangre (pH, lactato, PaCO₂)

Otras determinaciones en nuestro modelo incluyeron las variables analizadas en la gasometría arterial. En el contexto del daño sistémico habría sido consistente el hallazgo de acidosis metabólica (con disminución de bicarbonato arterial) acompañada de hiperlactatemia. Sin embargo no encontramos cambios significativos en el pH arterial (que mostró una tendencia no significativa a una moderada disminución), ni en la concentración arterial de bicarbonato o de lactato, sugiriendo un flujo arterial sistémico y un metabolismo celular preservado en el contexto de VILI. Estos hallazgos (ausencia de cambios en el pH, bicarbonato y lactato) apoyan también el concepto (antes discutido) de que otros cambios detectados se explican mejor por el desarrollo de la respuesta inflamatoria sistémica que por una disminución en el flujo sistémico.

Cabe destacar la ausencia de los cambios en la PaCO₂. En efecto, la misma característica esencial del modelo (al aumento de V_T) conlleva necesariamente un aumento de la ventilación alveolar ($V_A=[V_T-V_D]*f$) y la consiguiente grave hipocapnia y alcalosis respiratoria ($PaCO_2=V_{CO_2}/V_A$). Este cambio (hipocapnia, alcalosis respiratoria) alteraría todas las variables bioquímicas analizadas, muy notablemente las mediciones relacionadas con la inflamación tisular y sistémica, invalidando por tanto cualquier interpretación de los hallazgos basada en una relación entre el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica y los cambios encontrados. Para evitar la confusión generada por este factor (hipocapnia y alcalosis respiratoria), es necesario que la PaCO₂ permanezca constante durante el experimento a pesar de la aplicación de un V_T elevado. Esto se consiguió mediante la prolongación del espacio muerto en los animales sometidos a V_T elevado con el objeto de mantener constante (i.e; comparable a la del grupo sometido a V_T bajo) la ventilación alveolar.

El aumento del espacio muerto se consiguió prolongando el circuito de conexión de la cánula traqueal del respirador, tal como se podría realizar en pacientes sometidos a ventilación mecánica. Puesto que la magnitud del espacio muerto necesario para mantener la ventilación alveolar en el contexto de la aplicación de un V_T elevado no es conocida, numerosas pruebas fueron necesarias antes de encontrar la longitud exacta de prolongación del circuito suficiente para mantener constante la PaCO₂ en el grupo sometido a V_T elevado. La exactitud en estos experimentos y el éxito logrado puede evaluarse al observar los valores casi idénticos de PaCO₂ en los diferentes grupos independientemente de la administración de un V_T elevado.

Respuesta inflamatoria pulmonar y apoptosis**Generalidades y TNF- α**

En nuestro estudio, la aplicación del V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS), en comparación con V_T bajo, se asoció con una respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar. Esta respuesta inflamatoria se caracterizó por una significativa mayor concentración de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 y (no alcanzando la significación

estadística) IL-1 β . Se objetivó asimismo que el V_T elevado se asoció con una mayor expresión de genes (TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1), en comparación con la administración de V_T bajo, y una menor expresión de CXCR-2 (receptor de MIP-2). A pesar de una tendencia a mayores concentraciones de IL-1 β en el tejido pulmonar, la concentración en el LBA de IL-1 β se encontraba disminuida significativamente (no se midieron otras citocinas en el LBA).

Estos cambios (variaciones en la misma dirección de todas las citocinas analizadas, cambios paralelos en la expresión génica correspondiente, y cambios recíprocos en la expresión génica de CXCR-2, el receptor de MIP-2) presentan una extraordinaria consistencia interna.

El desarrollo de una respuesta inflamatoria pulmonar como consecuencia de la ventilación mecánica con V_T elevado ha sido descrito en numerosos estudios y no constituye ninguna novedad (referencias). Sin embargo, la documentación de esta respuesta es de fundamental importancia para la caracterización del presente modelo. En efecto, la demostración de un aumento de la concentración de citoquinas y de su correspondiente expresión génica es necesaria para fundamentar la validez del modelo, puesto que el concepto de *daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica (VILI)* se encuentra basado precisamente en la demostración de la respuesta inflamatoria en el tejido.

Por ejemplo Chiumello y cols [254] sometieron ratas a varias estrategias ventilatorias durante cuatro horas tras la administración intratraqueal de HCl. Encontraron en el suero de animales sometidos a V_T alto ($V_T=42\text{ml/kg}$ PEEP=0 cm H₂O) niveles más elevados de TNF- α entre la primera y la cuarta hora y de MIP-2 tras la primera hora. En fluido de LBA se encontró un aumento significativo de TNF- α y MIP-2 a la cuarta hora en el grupo sometido a V_T elevado.

Tremblay y cols [4] describieron elevación de TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6 y MIP-2 en el BALF de ratas sometidas a distintas estrategias lesivas de ventilación durante dos horas apoyando el papel de las citoquinas tanto para iniciar como para propagar localmente y de forma sistémica la respuesta inflamatoria.

Nuestros resultados del análisis de la concentración de TNF- α en tejido pulmonar son concordantes con los de otros estudios que usan distintas estrategias ventilatorias [4].

Por ejemplo, Tremblay y cols [4] producen en ratas VILI mediante administración de LPS intravascular seguida de dos horas de ventilación mecánica (en un modelo *ex vivo*, no perfundido) y analizan el efecto de diferentes estrategias ventilatorias empleando diferentes V_T y niveles de PEEP (control: $V_T=7\text{ml/kg}$ y PEEP=3cmH₂O, Sobreventiladas: $V_T=40\text{ml/kg}$ y PEEP=0cmH₂O, $V_T=15\text{ml/kg}$ y PEEP=10cmH₂O, $V_T=15\text{ml/kg}$ y PEEP=0cmH₂O) ventiladas durante 2 horas sobre la producción de diferentes citoquinas pro-inflamatorias en pulmones de rata pre-tratadas y no pre-tratadas con LPS. Encontraron en el grupo pretratado y en el no-pretratado con LPS y ventilado con V_T 40ml/kg y con PEEP=0 un aumento significativo de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 y MIP-2 en el fluido de LBA. Siendo mucho mayor en el grupo tratado con LPS y en la expresión del genes de TNF- α , resultado mayor expresión en el grupo ventilado con $V_T=15\text{ml/kg}$ y PEEP=0cmH₂O.

En base a los experimentos de Tremblay y cols [4]; Ricard y cols [104] repitieron la misma estrategia ventilatoria *in vivo* en ratas, y no encontraron diferencias en los niveles de TNF- α tanto en fluido de LBA como en el suero entre los distintos grupos de estudio no pre-tratados con LPS. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los grupos con y sin pretratamiento con LPS que recibieron la estrategia ventilatoria lesiva.

Los resultados de Tremblay y cols y de Ricard y cols [4, 104] pueden ser interpretados de múltiples formas y ponen de manifiesto algunas inconsistencias en relación a la liberación de TNF- α en el VILI. Una explicación puede estar en relación con las características del modelo *ex vivo*. El modelo *ex vivo* (no perfundido) puede exhibir una respuesta determinada en parte por el efecto de la isquemia, que puede *per se* inducir una liberación de citoquinas de forma tiempo dependiente. Otro elemento explicativo de la discrepancia entre los experimentos *ex vivo* versus *in vivo*. El modelo *ex vivo* (no perfundido) puede exhibir una respuesta determinada en parte por el efecto de la isquemia, que puede *per se* inducir una liberación de citoquinas de forma tiempo dependiente. Otro elemento explicativo de la discrepancia entre los experimentos *ex vivo* de Tremblay y cols (mostrando liberación de TNF- α en relación con la aplicación de V_T elevado) y de Ricard y cols (no mostrando liberación de TNF- α *in vivo*) puede ser la falta de reproducibilidad de los resultados entre laboratorios, sobre todo en cuanto al tiempo total de isquemia en el pulmón. En ambos grupos se reportaron los resultados del análisis de TNF- α en el fluido de LBA. Esto puede infraestimar los niveles de TNF- α totales en el pulmón si se compara con las mediciones en muestras de tejido pulmonar. Por ejemplo, si el daño ocurre en la vía aérea pequeña y en los alveolos, pero también ocurre en el intersticio, la evaluación de citoquinas en todo el pulmón de forma homogénea es más completa (pequeña vía aérea, alveolo e intersticio) que en el fluido de LBA (pequeña vía aérea y alveolo).

En el presente trabajo, nosotros analizamos el TNF- α de forma homogénea, sino que analizamos solamente el lóbulo inferior derecho. Otro motivo que explicaría nuestros resultados discrepantes de los niveles de TNF- α es el comportamiento cinético de TNF- α . Un análisis de la cinética de la expresión de TNF- α en un periodo de tiempo más prolongado de ventilación mecánica podría ayudar a resolver alguna de las inconsistencias mencionadas. Por ejemplo muchas citoquinas que se liberan inicialmente (como el TNF- α) pueden encontrarse aumentadas en los minutos siguientes a la aparición del daño, mientras que en otros estudios la expresión de TNF- α puede ser bifásica, teniendo 2 picos durante el daño pulmonar [258].

Nuestros resultados sobre la expresión del gen de TNF- α son semejantes a los encontrados por otros investigadores. Tremblay y cols [6], usando un modelo *ex vivo* de VILI, encontraron un incremento significativo de la expresión de TNF- α en el tejido pulmonar sometidos a V_T alto. Asimismo Imai y cols encontraron un incremento no significativo de la expresión de TNF- α en un modelo *in vivo* de ratas ventiladas con V_T elevado.

De forma general, nuestros resultados y los anteriormente publicados soportan el concepto de una liberación de TNF- α en el tejido pulmonar durante el desarrollo de VILI. Sin embargo es necesario llevar a cabo estudios de cinética de determinaciones

realizadas en homogenados de todo el tejido pulmonar y en fluido de LBA para encontrar en qué momento (o momentos) ocurren los picos de expresión de TNF- α .

IL-1 β

Hemos encontrado que la ventilación mecánica con V_T alto induce un aumento aunque no significativo de la IL-1 β , en el tejido pulmonar. Sin embargo se encontró una disminución significativa de la concentración de IL-1 β en el LBA.

La aparente discrepancia en estos resultados (disminución de la concentración en LBA y tendencia a aumento en la concentración en tejido pulmonar) ya ha sido observada en estudios previos. Copland y cols [129] encuentran en un modelo en ratas de VILI (control: no ventiladas sobreventiladas: 25ml/kg PEEP=0 durante 180 minutos) un aumento tiempo dependiente de los niveles de pro IL-1 β en el tejido pulmonar que alcanzó su pico máximo a los 90 minutos en comparación con el grupo control.

No se apreciaron cambios en la forma secretada, es decir, la forma activa de IL-1 β . Además demostraron que la IL-1 β se localizaba en el epitelio bronquial en las ratas que desarrollaban VILI. Por otro lado Frank y cols [259] encontraron menor concentración de IL-1 β en el BAL del grupo que recibió V_T alto en comparación con el grupo que recibió V_T bajo. Estos hallazgos contrastan con los de Tremblay y cols; quienes encontraron en su modelo *ex vivo* de VILI un aumento transitorio de IL-1 β en el LBA [4]. Sin embargo Ricard y cols también encontraron en un modelo *in vivo* una disminución de la concentración de IL-1 β en el fluido de LBA. Sin embargo, Ricard y col también encontraron en un modelo *in vivo* una disminución de la concentración de IL-1 β en el fluido de LBA.

En consideración a los resultados del presente estudio y de los publicados previamente, no se puede explicar de forma combinada los hallazgos de un aumento de la concentración de IL-1 β en el tejido pulmonar y de una significativa disfunción del LBA. Es posible que la IL-1 β se libere al intersticio y espacio alveolares en condiciones de inflamación inducida por la ventilación mecánica y que la fijación de los receptores (o quizá su destrucción en el espacio alveolar por proteínas) explique una disminución de su concentración en el LBA.

El papel fisiopatológico de IL-1 β en el VILI ha sido documentado por Frank y cols [259], en un modelo de ventilación mecánica en ratas sometidas a $V_T=30$ ml/kg y PEEP=0 cmH₂O durante 7 horas. El bloqueo de la acción de IL-1 β mediante la administración *i.v.* de IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1 β) atenuó el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar [259] También se ha reportado que la administración de IL-Ra en aerosol disminuye la extravasación de leucocitos en el tejido pulmonar en el VILI [260]

IL-6, MIP-2, MCP-1

Nuestros resultados también demostraron un aumento tanto de la concentración de la proteína como de la expresión génica de IL-6, MIP-2 y MCP-1 en animales sometidos a V_T elevado en comparación con V_T bajo. La consistencia de los resultados viene apoyada por el hallazgo de una disminución en la expresión génica de CXCR-2, el receptor de MIP-2. Sin embargo, la expresión génica de CCR-2 (el receptor de MCP-1) no cambió en el grupo sometido a V_T elevado en relación con el grupo sometido a V_T bajo. La ausencia de coincidencia universal entre la concentración tisular de la proteína y de la expresión del gen del receptor correspondiente probablemente se explique por diferencias en la cinética de la expresión en el mRNA y de la proteína.

La IL-6 y MIP-2 son marcadores sensibles de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica. Esta hipótesis se confirmó en ratas ventiladas [6, 255, 261-265]. Recientemente se ha demostrado la liberación de IL-6 en el aspirado traqueal de niños sanos sometidos a ventilación mecánica [261]. MIP-2 (el equivalente murino a la IL-8 humana) juega un papel importante tanto en el reclutamiento de neutrófilos y como en el remodelamiento vascular cuando se desencadenan un proceso inflamatorio inducido por el estiramiento debido a la ventilación mecánica [265, 266].

Nuestros hallazgos en nuestro modelo de VILI de un aumento de la concentración y de la expresión génica de IL-6, MIP-2 y MCP-1 concuerdan con observaciones previamente publicadas [216-220]. En pulmones perfundidos y ventilados *ex vivo* durante 2 horas con $V_T=40\text{ml/kg}$ y $\text{PEEP}=0\text{ cmH}_2\text{O}$ se encontró (en comparación con $V_T=7\text{ml/kg}$ y $\text{PEEP}=3\text{cmH}_2\text{O}$) un aumento en la expresión génica de IL-6 en el tejido pulmonar y en el fluido de LBA [6].

La causa de la estimulación del sistema inmune innato en el VILI está probablemente en relación con la activación del factor de transcripción NF κ B inducida por un mecanismo de mecanismo de mecanotransducción que induce la expresión de mediadores inflamatorios [255, 262, 263].

TLR-4

Entre las mediciones indicativas del estado inflamatorio incluimos la determinación de la concentración de TLR-4 en el tejido pulmonar. Los receptores tipo Toll (TLRs) desempeñan un papel importante en la respuesta inmune a patógenos [267]. Esta familia de 9 miembros activa una serie de vías de señalizaciones altamente conservadas y complejas que conducen a la activación de NF- κ B para la iniciación de varios procesos, como la inflamación, la respuesta inmune innata y los mecanismos de reparación. Algunos TLRs tienen ligando específicos, como por ejemplo la LPS y el DNA viral, que son ligandos de TLR-4 y TLR-3 respectivamente. Recientemente se ha demostrado que los TLRs pueden ser activados tras un insulto no séptico, como por ejemplo mediante la aspiración del ácido [75] y la ventilación mecánica [268].

El papel de TLR-4 en la respuesta inflamatoria a la ventilación mecánica ha sido previamente explorado. Veneker y cols [268] demostraron que en los animales

deficientes de TLR-4 se reduce la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica. Aún no se ha determinado los activadores endógenos específicos de los TLRs, pero dentro de los candidatos se incluyen a los componentes de la matriz modificados, ácido hialurónico, HMGB-1 y fosfolípidos oxidados (Fig #). En este estudio, se ventilaron ratones (V_T bajo: 8ml/kg, PEEP=4cmH₂O

La activación de TLR-4 da lugar a la activación de dos vía de señalización, MYD88 y TRIF[269].

La vía de señalización mejor caracterizada es la de MYD88 y la que activa de manera rápida al NF- κ B [270]. Consiste en que MYD88 recluta a IRAK (Kinasa asociada a IL-IR) y TRAF-6 conllevando a la activación de los complejos IKK $\alpha/\beta/\gamma$.

La señalización a través de TRIF se concreta a través de IKK- ϵ , que activa a IRF-3 y la expresión de los genes de IFN inducible. También se demostró que TRAF-6 interacciona con TRIF a través del dominio n-terminal de TRIF y de esta manera activa a NF- κ B in vitro [271]. Imai y cols [75] demostraron que la vía de TRIF (TLR4-TRIF-TRAF-6) y no a través de MYD88 controla la inflamación en la respuesta a la lesión pulmonar inducida por la aspiración de ácido o ante un patógeno viral.

Vaneker y cols [270] utilizaron ratones modificados genéticamente (wild type y knock out para TRIF) sometidos a ventilación mecánica con $V_T=8$ ml/kg y PEEP=4 cm H₂O, $FiO_2=0,40$ durante 4 horas. El estiramiento inducido por la ventilación mecánica activó una respuesta inflamatoria local y sistémica. Se asoció con un incremento de IL-1 α , IL-1 β y (Keratinocyte-derived chemokine (KC, CXCL1) que es un quimioatrayente de neutrófilos y actúa vía receptor CXCR2 en animales *wild type*, mientras que en animales KO para TRIF sólo se encontró un modesto incremento de IL-1 β y CK. Por otro lado, los animales KO para TRIF exhibieron una reducción de la activación de NF- κ B. Los animales *wild type* presentaron mayores cambios en la concentración de IL-6 y de CK en comparación con los animales KO para TRIF.

Se encontraron resultados en guardan consonancia con nuestros resultados y con los de otros estudios previos en animales [268, 270] y clínicos [272, 273].

Por ejemplo Vaneker y cols [268] demostraron que TLR-4 está involucrado en la respuesta inflamatoria desencadenada por la ventilación mecánica.

Apoptosis

El proceso de la apoptosis es fundamental para el desarrollo y la función pulmonar [274]. La apoptosis juega un papel fisiopatológico importante en la remodelación de tejido pulmonar eliminando tanto el exeso de células epiteliales como las células mesenquimales tras la lesión [275].

Nuestros resultados sugieren que la ventilación mecánica con V_T alto induce apoptosis en el parénquima pulmonar. El número de células fluorescentes por la técnica del TUNEL es unas 4 veces mayor en los animales sometidos a V_T elevado en comparación con los animales sometidos a V_T bajo .

Este efecto se observa en las imágenes de microscopía de fluorescencia, donde se aprecia que el incremento de la apoptosis potencia la fluorescencia del sustrato que se une a las hebras fragmentadas de DNA. Las células apoptóticas parecen localizarse en la mucosa de la vía aérea y en la pared alveolar.

Estudios previos han demostrado que una estrategia lesiva de ventilación mecánica *in vivo* induce apoptosis en neumocitos tipo II y en células bronquiales, y el estiramiento celular *in vitro* induce apoptosis en las células epiteliales alveolares [276-278]. Para reconocer mediante inmunohistoquímica que tipo de células sufren apoptosis es necesario realizar un doble marcaje: un marcaje para apoptosis (TUNEL); y otro marcaje bien con anti-citoqueratina 18 (para localizar células epiteliales) o bien con anti-proteína C prosurfactante (para localizar los neumocitos tipo II).

Nuestros resultados están en consonancia con los resultados de otros estudios en los que se demuestran tanto *in vivo* (ventilación mecánica) como *in vitro* (estiramiento mecánico) que el estiramiento mecánico induce apoptosis, que afecta sobre todo a células epiteliales alveolares tipo II [279-282].

Yasmin y cols, demostraron apoptosis en células alveolares tipo II procedentes de rata sometidas a un estiramiento del 22% a 3Hz durante 1 hora [279]. Stefan-Hammerschmidt y cols encontraron un 24% de apoptosis en células alveolares tipo II sometidas a un estiramiento del 60% durante 24 horas [283]. Ju Gao y cols también encontraron apoptosis utilizando un régimen de 20% de estiramiento durante 6 horas [282]. Estos estudios en modelos en células aisladas presentan ciertas limitaciones. En primer lugar, se ha eliminado la influencia de otros tipos celulares. En segundo lugar, no se tomó en cuenta la localización inter-espacial, ya que realmente los neumocitos tipo 2 se sitúan de manera preferente en las esquinas de los alveolos. Por estas razones es muy difícil interpretar los resultados de estudios en cultivos celulares porque no se puede imitar el tipo de régimen de estiramiento al que son sometidas estas células en el pulmón bajo condiciones fisiológicas.

¿Hay evidencia de activación de la apoptosis en las células tipo dos por la deformación durante la respiración fisiológica *in vivo*? Estudios *in vivo* demuestran que la ventilación mecánica con V_T alto activa la apoptosis de las células epiteliales que tapizan los alveolos, sobre todo los neumocitos tipo II y las células epiteliales de las ramas bronquiales. Makena y cols, encontraron en el parénquima pulmonar de ratones ventilados con $V_T = 25 \mu\text{l/g}$ durante 4 horas un número significativo de la apoptosis en células alveolares tipo II, tanto mediante TUNEL como mediante la determinación de caspasa-3 mediante Western blot, con respecto al grupo normoventilado [278]. En estudios en humanos sometidos a ventilación mecánica se encontró un aumento en la actividad apoptótica de las células epiteliales y bronquiales pero no de células de origen mesenquimal [284].

La apoptosis puede ocurrir tanto por la vía extrínseca o intrínseca (mitocondrial). En el caso de la apoptosis en el VILI, es desconocido en el momento presente el mecanismo de activación de la apoptosis en el parénquima pulmonar. Algunos estudios han demostrado una activación de la vía intrínseca. Por ejemplo, Kroon y cols. sugieren que la ventilación mecánica y las células estiradas activan la vía FasL/Fas debido a que encuentran un incremento en la expresión de FasL y

unaumento de la caspasa 8, que da lugar a la activación de las caspasas efectoras 3 y 7. Otra alternativa es que el estiramiento mecánico de las células podría incrementar el FasL soluble mediante la ruptura proteolítica de FasL de la membrana a través de ADAM y MMP14. FasL se podría unir a los receptores de las células epiteliales induciendo apoptosis [285, 286].

Por otro lado Egr1 es un regulador transcripcional proinflamatorio que coordina la respuesta proinflamatoria [287, 288], sobre todo de genes relacionados con el desarrollo y la apoptosis [287], incluyendo FasL [289]. El incremento de la expresión tanto de Egr1 y FasL de las células alveolares tipo II como consecuencia de la ventilación mecánica sugiere que Egr1 puede activar la vía extrínseca a través de la sobre-expresión de FasL.

Otro posible mediador para la apoptosis es la IL-8. Se sabe que Egr-1 regula la expresión de IL-8 [290] y que niveles elevados de IL-8 inducen apoptosis vía FasL, ya que su expresión también se incrementa [291]. Por otro lado, nosotros hemos encontrado un aumento significativo en los niveles de proteínas y de expresión génica de MIP-2 en tejido pulmonar procedente de animales sometidos a V_T elevado en comparación con V_T bajo, que en parte es mediada también a través de la vía Egr1 [277].

En resumen, nuestro hallazgo de un aumento de la apoptosis en tejido pulmonar procedente de animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado aporta validez a nuestro modelo de VILI. El aumento de la apoptosis asociado al VILI o al estiramiento *in vitro* de células epiteliales alveolares ya ha sido reportado previamente. Sin embargo, la demostración de este fenómeno en el presente modelo es de gran importancia tanto para una más extensa documentación del modelo como para reconocer otra variable que pudiera ser objeto de estudio en el caso de implementar alguna medida terapéutica, como es el caso de la DDS en el presente estudio.

Respuesta inflamatoria: determinaciones séricas

Es conocido que la respuesta inflamatoria local inducida por la ventilación mecánica no queda confinada al pulmón, sino que se pueden observar cambios en la concentración de citoquinas en el suero y en otros órganos. Este fenómeno, denominado *descompartmentalización* de la respuesta inflamatoria, explica los cambios en el sistema inmune innato en órganos diferentes del pulmón durante la ventilación mecánica con V_T elevado. Las citoquinas liberadas por las células del parénquima pulmonar durante el insulto mecánico no permanecen en el espacio intersticial o intraalveolar, sino que acceden a la circulación y pueden ser detectadas en la sangre. Estas citoquinas circulantes pueden estimular el sistema inmune innato en diferentes órganos y sistemas, produciendo daño a distancia del pulmón.

La documentación de este fenómeno es importante para demostrar que el modelo es útil para explicar los mecanismos del daño no pulmonar asociado a la ventilación mecánica. Por otro lado, la demostración de los cambios sistémicos asociados a la ventilación mecánica tiene particular relevancia clínica, puesto que los pacientes con SDRA (e, hipotetizamos, con VILI, entidad no reconocible actualmente en pacientes)

facilecen como consecuencia de shock y fracaso secuencial de órganos (fracaso multiorgánico), más que como consecuencia de hipoxemia en el contexto de la insuficiencia respiratoria.

Nosotros encontramos un aumento significativo de la concentración sérica de MIP-2, y (sin alcanzar la significación estadística) de IL-1beta. Estos resultados son consistentes con una descompartmentalización de la respuesta inflamatoria inducida en el pulmón por la ventilación mecánica con V_T elevado. Esta conclusión (sobre la descompartmentalización de la respuesta inflamatoria en el VILI) esta reforzada por el hallazgo de cambios significativos en la concentración de algunas citoquinas en el tejido intestinal como órgano no pulmonar (*vide infra*).

La propuesta de que la elevación sérica de MIP-2 procede del tejido pulmonar es una asunción que hay que justificar. De hecho como se discutirá en detalle más abajo, el intestino (y las bacterias intestinales) pueden tener un papel en la producción de la citoquinas que se refleje en determinaciones séricas. Sin embargo, como se discutirá más abajo, nosotros encontramos una marcada disminución de la concentración tisular de MIP-2 en el intestino, acompañada de una casi supresión de la expresión génica de MIP-2 y de CXCR-2, su receptor. Por tanto, parece razonable asumir que la MIP-2 detectada en el suero procede del pulmón, donde su concentración se encontró en efecto, muy elevada. Otras citoquinas cuya expresión se encontró elevada en tejido pulmonar de animales sometidos a VILI no presentaron un aumento en la concentración sérica. Parece, pues, que en nuestro modelo la descompartmentalización de la respuesta inflamatoria sólo puede ser detectada mediante la determinación de MIP-2, o quizá mediante la determinación de otras citoquinas no determinadas por nosotros.

La descompartmentalización de la respuesta inflamatoria ha sido descrita en otros modelos de VILI [150, 254, 261, 265]. Por ejemplo, Guery y cols [150] encontraron un aumento de la concentración sérica de TNF- α y un aumento de la permeabilidad intestinal en ratas sometidas a ventilación mecánica con V_T elevado. Siguiendo la misma línea Haitsma y cols [261] ventilaron ratas durante 90-240 minutos con diferentes estrategias (V_T en ml/kg /PEEP en cmH₂O: 32/6, 32/0 y 13/3) y encontraron un aumento de la concentración sérica de IL-6 y MIP-2 sólo en las ratas ventiladas con V_T alto, sin embargo en el LBA la concentración de MIP-2 aumentó con las tres estrategias ventilatorias; sugiriéndonos que la VM induce una respuesta inflamatoria local pero sólo las estrategias ventilatoria lesivas son capaces de promover la descompartmentalización de mediadores inflamatorios.

Algunos de nuestros resultados no son exactamente coincidentes con los resultados de estudios antecedentes utilizando otros modelos de VILI. Por ejemplo, Chiumello y cols [254] inducen VILI en ratas mediante aspiración con HCl seguida de cuatro horas de ventilación mecánica (modelo de doble daño); Los niveles de MIP-2 y TNF- α empiezan a elevarse a partir de las 2 horas en el LBA y en el suero TNF (a partir del tiempo basal) y MIP-2 (a partir de la 1ra hora). Comparandolo con nuestros resultados, es probable que en nuestro modelo, de un solo daño y de corta duración (2,5 horas) no sea tan agresivo como el modelo de Chiumello para que no haya un aumento de TNF- α en el suero y si de MIP-2. Sin embargo los hallazgos encontrados en el

compartimento pulmonar fueron similares, es decir que se detectó un aumento de la concentración proteica y de genes de MIP-2 y TNF- α en el parénquima pulmonar. La respuesta inflamatoria activada en el parénquima pulmonar (elevación de MIP-2 y TNF- α) y desde el compartimento alveolar e intersticial vertirse al circuito sanguíneo, proceso que puede ocupar más tiempo de las dos horas de estudio.

Estas discrepancias pueden ser explicadas por diferencias en los modelos (insulto único o doble), o por distinta cinética de liberación de las citoquinas analizadas.

Sin embargo, existe la coincidencia fundamental entre nuestros resultados y los de otros estudios en que la ventilación mecánica con V_T elevado evoca una respuesta inflamatoria pulmonar que puede ser detectada mediante la determinación de la concentración del tejido pulmonar de diferentes citoquinas.

Respuesta inflamatoria intestinal

Se analizó el tejido intestinal como órgano o sistema diferente del pulmón cuyos cambios en la respuesta inflamatoria a la ventilación mecánica planeamos estudiar. Puesto que el objetivo principal de la presente investigación es demostrar el papel de las bacterias intestinales en la respuesta pulmonar a la ventilación mecánica, el estudio del sistema inmune innato intestinal es de obligada consideración.

La afectación no pulmonar en el VILI ha sido estudiada en investigaciones previas. Nosotros hemos analizado este aspecto en la biología del VILI (es decir, la afectación de órganos diferentes al pulmón asociada a la ventilación mecánica con V_T elevado) al discutir la validez de nuestro modelo experimental (*vida supra*).

Aunque generalmente no reconocido, el tejido intestinal presenta un papel fundamental en la respuesta inmune innata. Las células epiteliales intestinales modulan la respuesta inflamatoria secretando citoquinas en respuesta a estímulos presentes en el lumen intestinal. MIP-2 es una quimioquina que atrae a los neutrófilos, y su secreción por parte de las células epiteliales es aumentada por estímulos inflamatorios como la IL-1 β . Ohtsuka y cols [292] demostraron *in vivo* que la producción de MIP-2 por las células epiteliales aumenta la migración de leucocitos al intestino.

Guery y cols [150] demostraron que la ventilación mecánica con V_T alto (30ml/kg) durante dos horas induce un aumento de la permeabilidad intestinal atribuido a un aumento de TNF- α a nivel sistémico. Para evaluar el papel de TNF- α en la permeabilidad a nivel pulmonar e intestinal administraron por vía sistémica anticuerpos anti-TNF- α . Se midió la concentración de albúmina marcada en el LBA y en la luz intestinal, encontrándose que la administración de anticuerpos anti TNF- α protege del aumento de la permeabilidad tanto a nivel intestinal como pulmonar. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el pulmón sometido a estrategias mecánicas perjudiciales puede desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica y la lesión y disfunción de órganos a distancia.

Cambios en la concentración de citoquinas en tejido intestinal

En el presente estudio hemos demostrado que la aplicación de V_T elevado, en comparación con V_T bajo, se asocia con una menor concentración intestinal de MIP-2 que se acompaña de un efecto marcado sobre la expresión génica de MIP-2, y CXCR-2, que disminuyen significativamente. La concentración tisular de otras citoquinas medidas (TNF- α , IL-6 y MCP-1), así como la correspondiente expresión génica, no cambió de forma significativa.

¿Cuál es la causa de que la ventilación mecánica con V_T elevado cause una disminución de la concentración de MIP-2 en el intestino? La interpretación de nuestros resultados está dificultada por la ausencia de estudios previos sobre la respuesta inmune intestinal en el contexto del VILI. Diferentes estudios han analizado la relación entre VILI y daño inflamatorio en otros órganos (Guery) sin embargo, en nuestro conocimiento, ningún estudio ha analizado la relación entre la ventilación mecánica con V_T elevado y el *status* del sistema inmune innato en otro órgano no pulmonar como el intestino. Varias explicaciones son posibles. (i) El aumento de MIP-2 en tejido pulmonar y en suero suprime la expresión de MIP-2 intestinal. Aún cuando el aumento de la concentración sérica de MIP-2 no es muy marcado, es posible que, debido al curso temporal de los cambios, sea suficiente en otros puntos en el tiempo para explicar los cambios encontrados en el intestino. (ii) El VILI se asocia con una respuesta antiinflamatoria (no medida en el presente estudio) que explique la supresión de MIP-2 en otros órganos. Aún cuando son necesarios nuevos estudios que analicen en el VILI la respuesta inflamatoria en órganos diferentes al pulmón, nuestros resultados indican claramente y de forma pionera cambios marcados en el sistema inmune innato en el intestino en el contexto del VILI.

Nuestros resultados nos permiten alcanzar conclusiones. Primero que el efecto es muy marcado (disminución muy significativa de la expresión génica de MIP-2). Segundo, que el efecto no es indiscriminado sobre citoquinas comúnmente determinadas. Es decir, sólo la determinación de MIP-2 y la expresión génica correspondiente demostró los cambios buscados asociados a la ventilación mecánica, mientras que la determinación de otras citoquinas, muy sensibles en general a cambios en el *status* del sistema inmune innato en otras condiciones (i.e, TNF- α , IL-6, MCP-1) y la expresión génica correspondiente no evidenció ningún cambio.

Nuestras conclusiones sobre los cambios de la respuesta del sistema inmune innato a la ventilación mecánica permiten fundamentar dos sugerencias para el diseño de futuros estudios sobre la relación entre el intestino y el pulmón durante la ventilación mecánica. El primero hace referencia al interés de profundizar en el estudio de los cambios en la vía de señalización intracelular de MIP-2.

Segundo, se ha de planear la determinación adicional de otras citoquinas no planeadas en el presente estudio, con el objeto de definir más extensamente el espectro de cambios inducidos por la ventilación mecánica sobre un panel más amplio de proteínas pro o anti-inflamatorias.

Resumen de la discusión de los resultados (Objetivo 1)

Cambios en la estructura y función pulmonares

Nuestro modelo es, pues adecuado y clínicamente relevante para el estudio de los mecanismos e intervenciones potencialmente terapéuticas en el daño pulmonar agudo (conocido clínicamente en general como SDRA, particularmente el causado por la utilización de ventilación mecánica con V_T elevado (VILI), condición que es objeto de la presente investigación. En efecto, nuestro modelo induce tras un periodo de ventilación mecánica con V_T elevado una condición caracterizada por deterioro de las propiedades mecánicas del pulmón, disfunción pulmonar (deterioro del intercambio gaseoso, hiperpermeabilidad alveolocapilar) así como cambios histológicos consistentes con el desarrollo del DAD.

Cambios sistémicos

Encontramos que la ventilación mecánica con V_T elevado se asocia, no sólo con cambios en la estructura y función pulmonares (vide supra), sino también con cambios no pulmonares, que incluyen hipotensión y disfunción vascular in vitro, hiperglucemia y elevación de la actividad de enzimas ubicuos en la economía (LDH, CK, GOT, GTP) que indican de forma inespecífica daño celular.

Cambios en la respuesta inflamatoria pulmonar y apoptosis

La ventilación mecánica con V_T elevado se asoció con una respuesta inflamatoria pulmonar caracterizada por elevación significativa de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 y sin llegar a la significación estadística) IL-1 beta, y de la expresión génica correspondiente.

Una de las características esenciales de un modelo experimental de VILI es la demostración de una respuesta inflamatoria pulmonar. Nuestro modelo reproduce satisfactoriamente esta condición. En combinación con los cambios descritos más arriba (deterioro de las propiedades mecánicas del pulmón, hiperpermeabilidad alveolocapilar, cambios histológicos consistentes con DAD), la demostración de una marcada y consistente respuesta inflamatoria hacen que nuestro modelo sea adecuado para el estudio del VILI, y del estudio de la fisiopatología y de intervenciones potencialmente terapéuticas de esta condición.

Cambios en la respuesta inflamatoria (determinaciones séricas)

En nuestro modelo se demuestran cambios en la concentración sérica de citoquinas (al menos de MIP-2) que indican descompartmentalización de la respuesta inflamatoria inducida en el pulmón por la ventilación mecánica con V_T elevado. Cambios semejantes en la concentración sérica de citoquinas han sido demostrados en modelos de VILI. La demostración de estos cambios es importante, pues puede ser explicativa de daño en órganos no pulmonares en el contexto de VILI.

Cambios en la respuesta inflamatoria intestinal

Nuestro modelo de VILI se asocia con cambios en el sistema inmune innato en órganos diferentes del pulmón como el intestino. Estos cambios se manifiestan, entre las citoquinas medidas en el presente estudio, por una disminución únicamente de la

expresión de MIP-2. Es posible que la medición de otras citoquinas en el tejido intestinal permita ampliar el espectro de citoquinas intestinales modificadas por el VILI.

Los resultados presentados sugieren que parte de la respuesta sistémica al VILI consiste en la inducción de cambios en el sistema inmune innato intestinal. El mecanismo íntimo del efecto del pulmón sometido a ventilación mecánica con V_T elevado sobre la disminución de la concentración tisular de MIP-2, y la disminución de la expresión génica de MIP-2 y CXCR-2 es desconocido. Especulamos que el pulmón sometido a ventilación mecánica con V_T elevado libera algún tipo de mediador anti-inflamatorio que ejerce un efecto inhibitor sobre el sistema inmune innato intestinal.

Discusión del Objetivo 2: Efecto del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica

Generalidades

El presente estudio es singular, puesto que hasta el momento no hay investigaciones que describan la influencia del tratamiento con DDS en los cambios inducidos por la ventilación mecánica, tanto a nivel pulmonar como sistémico (i.e; determinaciones en suero y en otros tejidos como el intestinal). Los efectos del tratamiento con DDS que se identifiquen en el VILI permiten concluir sobre el papel de las bacterias intestinales en la respuesta inflamatoria (pulmonar y no pulmonar) inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado.

Existen estudios sobre el efecto de la DDS en otros modelos de enfermedad. Por ejemplo, Horton y cols [293] en un modelo de quemadura demostraron que la administración de DDS (polimixina E, tobramicina y flucitocina) corrige las alteraciones metabólicas (cambios en el pH, y concentración de lactato, exceso de bases y concentración de Ca^{++} en sangre) y hemodinámicas (hipotensión). Posteriormente, los mismos autores estudiaron un modelo de quemadura y sepsis inducida mediante la administración por vía intratraqueal de *Streptococcus pneumoniae* [199]. Se objetivó que con el tratamiento con DDS protegió de las alteraciones metabólicas y hemodinámicas.

En este contexto, tras ofrecer una interpretación plausible de los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones, nuestra discusión concluye (ver más abajo) con una propuesta sobre los mecanismos de acción del tratamiento con DDS en el daño pulmonar y no pulmonar inducido por la ventilación mecánica; y un esquema fisiopatológico propuesto sobre el papel de las bacterias intestinales en la respuesta del sistema inmune innato ante ciertos estímulos (i.e; en nuestro caso la ventilación mecánica). La particular originalidad de nuestra investigación hace que estas conclusiones no puedan compararse con las alcanzadas tras el análisis de otros resultados en un modelo semejante, sino que tengan que ser elaboradas tras considerar (i) el conocimiento actual sobre los efectos del tratamiento con DDS en otros modelos experimentales, así como (ii) una interpretación de nuestros resultados.

Estructura y función pulmonares: Características mecánicas

En nuestro modelo, el tratamiento con DDS se asoció con una tendencia (no significativa) a una menor elevación de la PIP y a una menor reducción de la distensibilidad del sistema respiratorio (C_{SR}) durante el período de ventilación mecánica. Paralelamente, el aumento de la resistencia de la vía aérea (R_{VA}) observado en el grupo que recibió ventilación mecánica con V_T elevado no se apreció en los animales que recibieron también ventilación mecánica con V_T elevado y fueron además tratados con DDS.

Especulamos que estos efectos beneficiosos del tratamiento con DDS sobre la mecánica respiratoria se explican por una menor formación de edema en el contexto de un efecto anti-inflamatorio del tratamiento con DDS. Este efecto antiinflamatorio asociado al tratamiento con DDS está en línea con (i) los efectos observados del tratamiento con DDS en los animales control (sometidos a ventilación mecánica con V_T bajo) sobre la concentración de varias citoquinas en tejido pulmonar, en el suero y en tejido intestinal, tal como se ha discutido más arriba; (ii) los efectos anti-inflamatorios del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado. Estos aspectos serán discutidos con más detalle más adelante.

Intercambio gaseoso

La hipoxemia inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado no se modificó por el tratamiento con DDS. Aún cuando la disminución de la PaO_2 durante la ventilación con V_T elevado se observó en ambos grupos (tratados y no tratados con DDS), sólo alcanzó la significación estadística en el grupo tratado con DDS. Pensamos que este efecto observado del tratamiento con DDS es sólo aparente, pues no tiene plausibilidad en el contexto de la constelación de cambios asociados al tratamiento con DDS observados en la presente investigación. Nuestra interpretación de los cambios en la oxigenación es, pues, que la ventilación mecánica con V_T elevado se asocia con hipoxemia que no es modificada por el tratamiento con DDS.

Permeabilidad alveolocapilar

Resulta de gran interés para concluir sobre los efectos del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado el hallazgo de una menor elevación de la concentración de proteínas en el LBA en los animales sometidos a V_T elevado y tratados con DDS que en animales sometidos a V_T elevado y no tratados con DDS. Este hallazgo del tratamiento con DDS sobre la hiperpermeabilidad alveolocapilar inducida por el V_T elevado está apoyado también por la determinación de una menor concentración de IgM en el LBA en los animales tratados con DDS. Se puede concluir, pues, sobre el efecto protector del tratamiento con DDS sobre la hiperpermeabilidad inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado.

Cambios histológicos

La ventilación mecánica con V_T elevado se asoció, como se ha señalado más arriba, con cambios histológicos característicos de DAD. Estos cambios, no siempre encontrados en modelos de DPA inducido por la ventilación mecánica (i.e; VILI), constituyen una característica muy interesante de nuestro modelo, pues el correlato histológico característico de SDRA en humanos es el DAD.

El tratamiento con DDS no cambió el score de daño pulmonar, que es una medición de la gravedad del DAD. En el contexto de los cambios del tratamiento con DDS sobre la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica, este hallazgo negativo (ausencia de cambios en el daño pulmonar histológico) indica que la respuesta inflamatoria, atenuada mediante el tratamiento con DDS, sigue siendo de suficiente intensidad (al menos en el pulmón) para inducir cambios histológicos indicativos de inflamación pulmonar (i.e., DAD).

Cambios sistémicos: Hipotensión

Como se ha indicado más arriba, la ventilación mecánica con V_T elevado se asoció con hipotensión durante el período de la ventilación mecánica. El tratamiento con DDS no modificó este cambio sobre la presión arterial.

El contexto general para interpretar este y otros hallazgos es la conclusión global del presente estudio, que se va configurando en torno a un efecto anti-inflamatorio del tratamiento con DDS.

El hallazgo negativo sobre el efecto del tratamiento con DDS sobre la hipotensión inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado sugiere que la atenuación de la inflamación asociada al tratamiento con DDS es insuficiente para disminuir los cambios en la presión arterial.

Alternativamente, es posible que los cambios en la presión arterial sean independientes del desarrollo de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, nosotros hemos apoyado en general la hipótesis de que la hipotensión asociada a la ventilación mecánica con V_T elevado se explica mejor en el contexto de la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica que por otros cambios (como serían los cambios en la precarga debidos a oscilaciones cíclicas de la PIP).

Determinaciones bioquímicas séricas (glucosa, LDH, CK, GOT, GTP)

La ventilación mecánica con V_T elevado se asoció con cambios en la concentración sérica de glucosa y en la actividad sérica de la LDH, CK, GOT y GTP.

Nosotros no encontramos que el tratamiento con DDS modificara en ningún caso (concentración de glucosa, actividad en suero de la LDH, CK, GOT y GTP) los cambios inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado. Estos hallazgos negativos contrastan con los resultados de estudios previos sobre los efectos del tratamiento con DDS en otros modelos (i.e; quemadura y sepsis), en los que se demostró una menor respuesta metabólica en animales tratados con DDS [197-199].

De forma análoga a la discusión previa sobre los efectos del tratamiento con DDS en la hipotensión inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado, se puede argumentar para explicar la ausencia de efecto del tratamiento con DDS sobre estas variables que la magnitud del efecto antiinflamatorio del tratamiento con DDS es insuficiente para corregir estas alteraciones asociadas al VILI, o bien que se trata de alteraciones en cuyo mecanismo no tiene un papel la respuesta inflamatoria.

Respuesta inflamatoria pulmonar y apoptosis

Los efectos de la ventilación mecánica con V_T elevado incluyeron un aumento de la concentración tisular y de la expresión génica de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1. Ahora bien, ¿Cuál es el efecto del tratamiento con DDS sobre la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado?.

Los efectos del tratamiento con DDS en el *status* del sistema inmune innato del pulmón han de ser considerados en dos condiciones: (i) en condiciones control, es decir, ventilación con V_T bajo (¿depende del sistema inmune innato pulmonar de la presencia de bacterias intestinales?); (ii) y en condiciones de VILI (¿modulan las bacterias intestinales la respuesta inmune pulmonar a la ventilación mecánica?).

En animales ventilados con V_T bajo, el tratamiento con DDS sólo afectó a la expresión tisular de MCP-1, que fue menor en animales tratados con DDS que en animales no tratados. La concentración de citocinas en tejido y la expresión génica de otros genes no se modificó por el tratamiento con DDS.

En animales sometidos a V_T elevado, el tratamiento con DDS atenúo el aumento de la concentración tisular de TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-1 β . La expresión génica fue similar en animales tratados con DDS que en animales no tratados.

Así pues, nuestros resultados indican un efecto supresor de la respuesta inmune :menor expresión génica de MCP-1 en condiciones basales (ventilación con V_T bajo), y menor elevación de citoquinas en tejido pulmonar en condiciones de VILI (ventilación mecánica con V_T elevado). Es decir, la presencia de bacterias intestinales contribuye a parte de la respuesta inmune del pulmón a la ventilación mecánica.

La falta de correspondencia de los cambios en la concentración tisular de citoquinas y de su expresión génica es difícil de explicar con el presente diseño. La ausencia de cambios en la expresión génica no indica necesariamente la existencia de cambios postranscripcionales como explicación de la disminución de la concentración tisular de citoquinas, La expresión génica y la expresión de proteínas están relacionadas de forma compleja, y es posible que cambios en la concentración de proteínas vayan precedidos por cambios paralelos en la expresión génica, la cual puede presentar en posteriores momentos cambios recíprocos a los encontrados en la concentración de proteína por un mecanismo de autorregulación en presencia de una menor concentración del producto del gen.

Nuestros resultados sobre los efectos del tratamiento con DDS en el VILI son originales y están precedidos por similares resultados en otras condiciones [150]. Como ya se ha mencionado en detalle en la introducción, existen trabajos que

demuestran en diferentes modelos (quemadura, sepsis, shock hemorrágico, isquemia-reperusión) una atenuación de la respuesta inflamatoria en animales que reciben DDS [196, 197, 199, 203].

Existe abundante literatura sobre el efecto de ciertos insultos ajenos al intestino (e.g; shock, sepsis, isquemia-reperusión, quemaduras) sobre la integridad y función (permeabilidad) intestinales [201, 222]. Recíprocamente, algunos de estos estudios han analizado también el efecto de intervenciones como el tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria [196, 197, 199, 203]. La conclusión es la presencia de bacterias intestinales contribuyen a la respuesta inflamatoria sistémica y al daño (inflamación) en otros órganos tras un insulto sistémico.

Guery y cols [150] demostraron en ratas ventiladas durante 2 horas con $V_T=30\text{ml/kg} + \text{PEEP}=9\text{ml/kg}$ o $V_T=10\text{ml/kg} + \text{PEEP}=2\text{cmH}_2\text{O}$, que el VILI se asociaba con una liberación de TNF- α a nivel sistémico y con un aumento de permeabilidad intestinal, que era atenuado mediante la administración de anticuerpos anti-TNF- α . Estos resultados apoyan la noción que el VILI se asocia con cambios en la función intestinal.

Horton y cols [198] demostraron en un modelo de quemadura en ratas que el tratamiento con DDS atenúa las alteraciones metabólicas, hemodinámicas y la respuesta inflamatoria asociada a la quemadura. El tratamiento con DDS atenuó el incremento de citoquinas proinflamatorias liberado por los cardiomiocitos, y proporcionó protección contra la disfunción cardíaca inducida por la quemadura. En otro modelo de quemadura y sepsis (inducida por la administración intratraqueal de *Streptococcus pneumoniae*)[199], los mismos investigadores encontraron que el tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria sistémica y cardíaca y disminuyó la bacteriemia inducidas por la sepsis.

¿Cuál es el mecanismo del efecto modulador de la respuesta inmune del tratamiento con DDS? Los estudios previos[196, 197, 199, 203]. Han argumentado que el insulto bajo estudio (quemadura, sepsis, shock hemorrágico, isquemia-reperusión) se asocia con una pérdida de la integridad y un aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal. Consiguientemente, la translocación bacteriana induce una respuesta inflamatoria que es parte del daño en los diferentes órganos que se observan en esos modelos. En condiciones de tratamiento con DDS, los efectos de la translocación de bacterias o sus productos se encuentran atenuados, puesto que la carga bacteriana intestinal está disminuida en presencia de DDS.

En nuestro caso, es posible que el VILI se asocie con una disrupción del epitelio intestinal y un aumento de la permeabilidad intestinal, con la consiguiente traslocación de bacterias o sus productos que amplifiquen la respuesta inflamatoria en el pulmón. En efecto, los hallazgos de Guery y cols [150] de un aumento de permeabilidad intestinal durante el VILI apoyan el concepto de un daño epitelial intestinal en el contexto de la ventilación mecánica con V_T elevado. En presencia de tratamiento con DDS, la carga bacteriana intestinal es menor y, por tanto, la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica se encuentra atenuada.

Otra explicación posible tiene relación con el papel de las bacterias intestinales en el *status* del sistema inmune innato en el epitelio intestinal. La hipótesis que planteamos

es que mediadores generados en el pulmón durante la ventilación mecánica inducen una respuesta inflamatoria en el intestino. Estas citoquinas de origen intestinal contribuyen a la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar. La eliminación de las bacterias intestinales suprime el sistema inmune innato del epitelio intestinal y atenúa por tanto, el componente intestinal de la respuesta inflamatoria observada en el contexto de VILI.

Los efectos antiinflamatorios del tratamiento con DDS que proponemos han de ser discutidos en el contexto de los efectos anteriormente comentados en esta discusión. En efecto, el tratamiento con DDS se asocia también con un menor deterioro de la mecánica del sistema torácico y una menor hiperpermeabilidad alveolocapilar en el VILI, como se ha discutido más arriba. Estos efectos beneficiosos sugieren una menor formación de edema, muy posiblemente debido a una respuesta inflamatoria atenuada. Esta interpretación es consistente con los hallazgos de una menor concentración de citoquinas en el pulmón en los animales que reciben tratamiento con DDS.

Apoptosis

La ventilación mecánica con V_T elevado se asoció con un significativo aumento de la apoptosis en el pulmón. Sin embargo, el tratamiento con DDS no modificó el grado de apoptosis inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado.

Respuesta inflamatoria: determinaciones séricas

La ventilación mecánica con V_T elevado se asocia con una elevación de la concentración sérica de MIP-2 y (sin llegar a la significación estadística) de IL-1 β . ¿Cómo afecta el tratamiento con DDS a la concentración sérica de citoquinas y a los cambios asociados al VILI?

En condiciones de ventilación con V_T bajo, el tratamiento con DDS se asoció a una significativamente menor concentración sérica de TNF- α y de IL-6. La presencia de bacterias intestinales es, pues, necesaria para el mantenimiento de un nivel de citoquinas (al menos de TNF- α y de IL-6) en el suero. Estos cambios (disminución de la concentración de TNF- α y de IL-6) en el suero. Estos cambios (disminución de la concentración de TNF- α y de IL-6) no se encontraron en el tejido pulmonar ni intestinal, luego la supresión de su concentración en suero debe ser originada por una disminución de la liberación de estas citoquinas por otro tejido. Es posible que, bien debido a un grado bajo de translocación de productos bacterianos en condiciones normales, o bien debido a otros mediadores inflamatorios originados en el intestino (no medidos por nosotros), otros tejidos (quizá el hígado) contribuyan a los niveles séricos de TNF- α y de IL-6. En ausencia de bacterias intestinales, al atenuarse ese grado mínimo de translocación de productos bacterianos o al disminuir la respuesta inmune del epitelio intestinal, disminuya la contribución del hígado a los niveles séricos de estas citoquinas. No obstante, no es posible ofrecer una justificada explicación del hallazgo de una menor concentración sérica de TNF- α e IL-6 en los animales tratados

con DDS. A la luz de otros estudios Horton y cols [198] han medido citoquinas en el suero y en sobrenadante de los cardiomiocitos procedentes de las ratas SHAM tratadas y no tratadas con DDS; encuentran una menor concentración de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 en las ratas tratadas con DDS en comparación con las no tratadas, estos resultados guardan consonancia con los nuestros en el suero.

En los animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado se apreció un aumento de la concentración sérica de MIP-2. Este aumento no se vio afectado por el tratamiento con DDS. Puesto que la ventilación mecánica con V_T elevado no se asoció con elevación de otras citoquinas, no es posible apreciar el efecto del tratamiento con DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado en la concentración de citoquinas. Sin embargo, es posible apreciar que el efecto supresor del tratamiento con DDS sobre la concentración sérica de TNF- α y la IL-6 en animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado y tratados con DDS presentaron (al igual que los sometidos a V_T bajo) una concentración sérica muy baja de TNF- α y de IL-6.

Nuestros resultados sobre los cambios en la concentración sérica de citoquinas están en línea con los hallazgos de los estudios discutidos más arriba [196, 197, 199, 203] que documentan una menor respuesta inflamatoria en condiciones de tratamiento con DDS, apoyando así el concepto del importante papel de las bacterias intestinales en la respuesta inmune intestinal ante un insulto sistémico.

Respuesta inflamatoria intestinal

La ventilación mecánica con V_T elevado se asoció con una disminución de la concentración tisular de MIP-2 y de la expresión génica de MIP-2 y CXCR-2. ¿Modifico el tratamiento con DDS la respuesta inmune en el tejido intestinal? Esta pregunta ha de ser respondida en dos condiciones: en condiciones de ventilación con V_T bajo (¿cuál es el papel de las bacterias en el mantenimiento del sistema inmune innato intestinal en condiciones normales?); y (ii) en condiciones de ventilación con V_T elevado (¿modulan las bacterias intestinales la respuesta intestinal a la ventilación mecánica?).

En condiciones de ventilación con V_T bajo, el tratamiento con DDS disminuyó marcadamente la concentración tisular de MIP-2 y aumentó la concentración de IL-6, y disminuyó la expresión génica de IL-6, MIP-2 y CXCR-2. Una vez más, nuestros resultados indican que la presencia de bacterias intestinales es necesaria para el mantenimiento de una expresión tisular de citoquinas, al menos para MIP-2, CXCR-2 e IL-6.

El efecto de la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la concentración tisular de citoquinas (disminución de la concentración MIP-2, elevación de la concentración de IL-6, y de la expresión génica de IL-6, MIP-2, CXCR-2) se mantuvo durante la ventilación mecánica con V_T elevado.

El aumento de la concentración tisular de IL-6 en presencia de una disminución de la expresión génica sugiere una inhibición de la transcripción debida a un aumento de la

concentración del producto (cuya elevación se explicará por un aumento de la expresión génica en algún momento anterior). Este resultado plantea una aparente discrepancia en el contexto de otros resultados de la presente investigación, que indican generalmente una disminución de la expresión de proteínas y genes en presencia del tratamiento con DDS, mientras que en el caso de la IL-6 se encuentran un aumento de la concentración tisular. En efecto, la relación entre las bacterias intestinales y la producción de citoquinas por el epitelio intestinal es compleja, y no resulta esperable que una intervención (en nuestro caso, la administración de tratamiento con DDS y la consiguiente eliminación de bacterias Gram-negativas) origine cambios en todas las variables medidas en la misma dirección.

Esta discrepancia (aumento de la concentración de IL-6 en tejido intestinal, en presencia de una disminución de la concentración de otras citoquinas) no ilustra sino la complejidad de las relaciones que proponemos estudiar (e.g; relación del epitelio intestinal- bacterias del lumen intestinal). La conclusión sobre el efecto modulador (en general supresor de la concentración de citoquinas y de su expresión génica, en algún caso, como la IL-6, aumentando su concentración tisular) mantiene su validez.

Existen estudios previos sobre el papel de las bacterias intestinales sobre el sistema inmune innato del epitelio intestinal. Volker y cols [203] demostraron que en ratas tratadas con DDS (polimixina E y tobramicina) un aumento de TNF- α e IL-6 en el tejido intestinal.

Bahrami y cols [294] co-cultivaron células del epitelio intestinal humano con bacterias comensales o patógenas. Encontraron que las bacterias comensales suprimen la expresión de genes de citoquinas asociadas a la respuesta inflamatoria, mientras que las bacterias patógenas inducen un aumento de la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias.

Igualmente Chen y cols [295] demostró en ratas quemadas que la administración de antibióticos de amplio espectro (*ampicilina, vancomicina, sulfato de neomicina y metronidazol* ad libitum durante cuatro semanas) se asociaba con la desaparición de la flora comensal y una menor concentración proteína de TLR-4 y NF κ -B y una disminución de la expresión de genes de TLR-4 en la mucosa intestinal. Esto vendría a confirmar el papel de la flora comensal en el mantenimiento de la inmunidad innata en el intestino a través de la señal de TLR-4. El estudio anterior (Bahrami) dice que las bacterias comensales suprimen. Tanto el estudio de Bahrami [294] de Chen [295] dicen que mantienen el sistema inmune innato.

Los estudios anteriores reportan resultados que son claramente complementarios de los encontrados por nosotros. La flora patógena (eliminada mediante el tratamiento con DDS) mantiene la activación del sistema inmune innato en el epitelio intestinal, lo cual explica el efecto en general supresor de la respuesta inmune asociado al tratamiento con DDS.

Como propone Volker y cols [203] no se puede excluir el efecto de otros mecanismos explicativos de algunos de los cambios observados, como son la estimulación de las células mononucleares del intestino por la polimixina, o la activación del sistema inmune innato por productos bacterianos procedentes de bacterias muertas como

consecuencia del tratamiento con DDS. Estos mecanismos podrían explicar algunos aspectos de los cambios observados como son la elevación de la concentración de IL-6 en tejido intestinal en animales tratados con DDS.

Proponemos que el pulmón sometido a un insulto (la ventilación mecánica con V_T elevado) libera un mediador anti-inflamatorio (no medido por nosotros) que suprime algunos aspectos del sistema inmune intestinal.

Por otro lado, el tratamiento con DDS modula (en general, inhibe) el sistema inmune innato intestinal, por tanto en condiciones de ventilación con V_T bajo como en condiciones de ventilación con V_T elevado. Por tanto, la presencia de bacterias intestinales es necesaria para el mantenimiento del sistema inmune innato intestinal.

Resumen de la discusión del objetivo 2

Los resultados de la presente investigación indica que el tratamiento con DDS suprime en condiciones normales (ventilación con V_T bajo) algunos aspectos de la respuesta inmune (disminución de la expresión génica de MCP-1 en tejido pulmonar, disminución de la concentración sérica de TNF- α y de IL-6, disminución de la concentración tisular del intestino de MIP-2 y de la expresión génica de MIP-2 y CXCR-2). En condiciones de VILI, la respuesta inflamatoria se encuentra en general atenuada por el tratamiento con DDS. Como se ha discutido en detalle, estos cambios se encuentran en línea con las investigaciones previas sobre el efecto del tratamiento con DDS en otras condiciones, como el shock hemorrágico, la sepsis, la quemadura y la isquemia-reperusión.

La conclusión es que la presencia de bacterias intestinales contribuye tanto al mantenimiento de un status normal (en condiciones de ventilación con V_T bajo) del sistema inmune innato, como al desarrollo de la respuesta inmune tras un insulto pulmonar (i.e; la ventilación mecánica con V_T elevado).

Efectos de la DDS sobre la estructura y función pulmonares

La discusión de estos hallazgos en el contexto de la literatura publicada se encuentra, como se ha señalado más arriba, dificultada por la ausencia de estudios previos sobre los efectos del tratamiento con DDS en el VILI.

Nosotros hemos encontrado que el tratamiento con DDS atenúa el deterioro de la mecánica pulmonar (indicando más posiblemente un efecto sobre el edema y, por tanto, sobre respuesta inflamatoria causante del edema) y la hiperpermeabilidad alveolocapilar en el contexto del VILI.

Estos cambios (en combinación con los observados en la respuesta inflamatoria, que se discutirán más adelante) son consistentes con un efecto anti-inflamatorio del tratamiento con DDS. Paralelamente, se puede concluir que las bacterias intestinales tienen un papel amplificador de la respuesta inflamatoria tras un insulto, en nuestro caso, la ventilación mecánica con V_T elevado.

El mecanismo que explica esta relación entre las bacterias intestinales y la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica se discutirá en detalle más adelante.

Efectos de la DDS sobre los cambios sistémicos

La ventilación mecánica con V_T elevado se asoció con cambios en la concentración sérica de glucosa y en la actividad sérica de la LDH, CK, GOT y GTP. Ninguno de estos cambios se modificó por el tratamiento con DDS. Es posible que la respuesta inflamatoria inducida por la ventilación mecánica no sea de la suficiente magnitud para atenuar estos cambios, o bien que estos cambios asociados al VILI no se expliquen por un mecanismo inflamatorio.

Efectos de la DDS sobre la respuesta inflamatoria pulmonar y apoptosis

Los cambios de la respuesta inflamatoria inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado (elevación de la concentración en tejido pulmonar de varias citoquinas) se encuentran atenuados en animales tratados con DDS. Este hallazgo permite concluir que la presencia de bacterias intestinales contribuye a la respuesta inmune pulmonar a la ventilación mecánica. Proponemos que el intestino, estimulado por mediadores inflamatorios procedentes del pulmón, contribuyen a la respuesta inflamatoria liberando mediadores que contribuyen a la respuesta inmune pulmonar. La presencia de bacterias intestinales es necesaria para el desarrollo de esta respuesta intestinal.

Efectos de DDS sobre las determinaciones séricas

El tratamiento con DDS se asocia con un efecto supresor de la respuesta inmune (menor concentración sérica de TNF- α y de IL-6), tanto en animales sometidos a V_T bajo como V_T elevado puesto que no se observaron estos cambios en la concentración de TNF- α e IL-6 en los tejidos analizados (pulmón e intestino) no se puede ofrecer una explicación mecanística de estos hallazgos. Sin embargo, en el contexto de los cambios asociados al tratamiento con DDS observados en el pulmón y en el intestino (ver más abajo) los resultados sobre los efectos del tratamiento con DDS en la concentración sérica de citoquinas apoyan el concepto del papel modulador de las bacterias intestinales en la respuesta inmune.

Efectos de DDS sobre la respuesta inflamatoria intestinal

La presencia de bacterias intestinales es necesaria para el mantenimiento del status del sistema inmune innato, al menos para la concentración de MIP-2, IL-6 y CXCR2.

Interpretación global de los resultados: Respuesta inmune a la ventilación mecánica con V_T elevado y efecto del tratamiento con DDS

Nuestros resultados han de interpretarse en el contexto de la literatura sobre los mecanismos del VILI y los efectos conocidos del tratamiento con DDS en el VILI y otras condiciones. Esta interpretación está dificultada por la ausencia de estudios

sobre específicamente los efectos del tratamiento con DDS en el VILI. Sin embargo, la consistencia interna de nuestros resultados y el conocimiento del papel de las bacterias intestinales en otras condiciones (i.e; sepsis, shock) permitirán una interpretación global plausible de nuestros hallazgos.

Los resultados previos sobre el tema que nos ocupa conducen a tres conclusiones: Primero, el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica se acompaña del daño intestinal. El VILI se asocia a daño de otros órganos (no pulmonares), entre ellos el intestino, donde se puede encontrar aumento de la permeabilidad [150]. Segundo, las bacterias intestinales contribuyen a la respuesta inflamatoria ante diferentes insultos. Ciertas condiciones, como el shock hemorrágico, la sepsis, la quemadura y la isquemia reperusión se asocian con pérdida de la integridad y aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal [196, 201, 203, 222, 296].

El tratamiento con DDS, al disminuir la carga bacteriana intestinal, previene parte de la respuesta a esos insultos, documentando el papel de las bacterias intestinales en el desarrollo de una respuesta inflamatoria ante diferentes insultos [196, 197, 199, 203]. Tercero, al *status* del sistema inmune innato del epitelio intestinal depende de su interacción con bacterias intestinales. El epitelio intestinal es muy activo desde el punto de vista de la respuesta inmune. El sistema inmune innato del epitelio intestinal depende de su interacción con las bacterias intestinales, con las que se encuentra en íntimo contacto [156]. Una disminución de las bacterias intestinales (e.g; mediante el tratamiento con DDS) disminuye marcadamente la capacidad del epitelio intestinal de mantener una respuesta inmune.

Los hallazgos descritos en la presente memoria son originales, pues el efecto del tratamiento con DDS en la respuesta inflamatoria asociada a VILI no se ha descrito previamente. La consistencia de los cambios observados permite, en el contexto de los resultados publicados por otros investigadores, ofrecer una explicación plausible y con sentido fisiopatológico de los cambios observados asociados al VILI y al tratamiento con DDS.

Nuestros resultados indican claramente, mediante la medición de varias citoquinas y de su correspondiente expresión génica, así como la determinación de otros cambios fisiopatológicos relacionados con el desarrollo de la respuesta inflamatoria (mecánica del sistema torácico, permeabilidad alveolocapilar), que el tratamiento con DDS ejerce un efecto supresor de la respuesta inmune, tanto en condiciones normales (ventilación con V_T bajo), como en condiciones de ventilación mecánica con V_T elevado.

Sin embargo a de ser señalado que la explicación mecánica concreta de la relación entre las bacterias intestinales y la respuesta inflamatoria ante un insulto (e.g; la ventilación mecánica con V_T elevado) escapa a la presente investigación. Es necesario el desarrollo de esta línea de investigación para identificar los mecanismos por lo que las bacterias intestinales contribuyen a la respuesta inflamatoria en el contexto de VILI, y para diseñar estrategias terapéuticas (quizá el tratamiento con DDS) que atenúen los cambios pulmonares y sistémicos asociados al VILI.

De la discusión precedente de nuestros resultados en el contexto de la literatura, emerge un esquema fisiopatológico como consecuencia de la interpretación más pausable de nuestros resultados. En condiciones control (ventilación mecánica con V_T bajo), la eliminación de bacterias gramnegativas intestinales mediante el tratamiento con DDS suprime algunos aspectos del sistema inmune innato intestinal. Este resultado es muy consistente, puesto que demostramos en el intestino una disminución significativa de la concentración tisular de MIP-2, y disminución de la expresión génica de MIP-2 y de CXCR-2. Asimismo, la misma tendencia (sin alcanzar la significación estadística, pero dando consistencia a los hallazgos significativos) se encontró en el caso de MCP-1 y de su expresión génica.

Por otro lado el tratamiento con DDS se asocia asimismo con una marcada disminución de la concentración sérica de TNF- α y de IL-6. Esta disminución no se observó en ninguno de los tejidos analizados (pulmón e intestino) por lo que es posible que otro órgano, probablemente el hígado, contribuya a los niveles séricos de estas dos citoquinas.

Especulamos que la liberación (quizá hepática) de TNF- α y de IL-6 y la expresión de MCP-1 depende en parte de alguna influencia que procedente del intestino, mediante la liberación intestinal de algún otro mediador inflamatorio. Esta capacidad intestinal de contribuir a la producción de citoquinas en otros órganos disminuye en condiciones de ausencia de bacterias intestinales.

El corolario de estos hallazgos hace referencia a la necesidad de las bacterias intestinales para el mantenimiento del sistema inmune innato en otros órganos.

La ventilación mecánica con V_T elevado induce una respuesta inflamatoria pulmonar, fenómeno ya reconocido en la literatura. Esta respuesta es (parcialmente) descompartimentalizada (elevación de la concentración sérica de MIP-2). La descompartimentalización fue demostrada sólo por la determinación de la concentración sérica de MIP-2 y no de otras citoquinas, sugiriendo que bien se debe sólo a MIP-2 o bien que se debe a otras citoquinas no medidas en la presente investigación. En el contexto de esta descompartimentalización, el intestino conoce la estimulación del sistema inmune innato en otro lugar de la economía (pulmón) y es estimulado para contribuir mediante la liberación de mediadores inflamatorios a la respuesta inmune pulmonar. La presencia de bacterias intestinales es necesaria para que el intestino contribuya a esta respuesta inmune pulmonar ante el insulto (la ventilación mecánica con V_T elevado). Este cross-talk intestino-pulmón está documentado por la menor elevación de citoquinas en tejido pulmonar en el VILI tras el tratamiento con DDS.

Sin embargo, la naturaleza de estos mediadores procedentes del intestino es desconocida. Especulamos que, puesto que la concentración sérica de TNF- α e IL-6 se encuentra muy disminuida en animales tratados con DDS, estas dos citoquinas quizá contribuyen a estimular el pulmón para el desarrollo de la respuesta inmune tisular como respuesta a la ventilación mecánica con V_T elevado en condiciones normales (presencia de bacterias intestinales).

En resumen, los resultados originales de la presente investigación permite alcanzar dos conclusiones fundamentales, con diferentes implicaciones. La primera conclusión, con una implicación fisiopatológica, es que la presencia de bacterias intestinales es necesaria para el desarrollo de una respuesta inmune en el pulmón sometido a un insulto como la ventilación mecánica con V_T elevado. La segunda conclusión, con implicaciones terapéuticas, es que el tratamiento con DDS atenúa algunos aspectos de la respuesta inflamatoria y de la disfunción pulmonar en el contexto del VILI.

Limitaciones de la investigación

Se ha discutido hasta ahora los efectos de la ventilación mecánica con V_T elevado en nuestro modelo. La documentación de estos cambios en el contexto del presente estudio es de gran importancia, porque permite defender la validez del modelo para el estudio de los mecanismos del VILI o el efecto de intervenciones terapéuticas. Sin embargo, todos los modelos animales de enfermedad presentan limitaciones. El reconocimiento de estas limitaciones es necesario con el objetivo de interpretar adecuadamente los resultados.

En primer lugar, se utilizó un $V_T=9\text{ml/kg}$ como estrategia no lesiva, que se encuentra fuera del rango aconsejado para su uso en pacientes (6-8ml/kg). Es conocido que el uso de $V_T=9\text{ml/kg}$ se asocia con un cierto, aunque leve, grado de inflamación y de daño pulmonar [265]. Sin embargo, consideramos que los cambios relativos observados (al comparar $V_T=9\text{ml/kg}$ con $V_T=25\text{ml/kg}$) son validos y permiten una descripción adecuada de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica, así como la descripción de variables cuyo estudio es posible para analizar el efecto de intervenciones terapéuticas (en nuestro caso, tratamiento con DDS).

En segundo lugar, la duración de la ventilación mecánica es de 2,5 horas, y es posible que en tiempos más cortos o más largos se observen cambios diferentes. Este efecto, la respuesta inflamatoria y, en general, los cambios asociados al uso de la ventilación mecánica con V_T elevado, presenta un curso temporal, cuyo estudio es necesario para la caracterización completa del modelo. En nuestro caso, tal caracterización se encuentra pendiente, en consideración a los recursos económicos y humanos que requiere. Sin embargo, esta limitación no resta validez a nuestros resultados, siempre que se considere en su interpretación que los hallazgos se refieren a un sólopunto del tiempo. De hecho, la consedieración de la naturaleza temporal de los cambios constituye una explicación de los hallazgos reportados, como se puede apreciar en la discusión de la presente memoria.

Crítica del modelo

Nuestro diseño no permite en todos los casos una interpretación de los resultados, por ejemplo, la aparente discrepancia en los hallazgos de una disminución de la respuesta inflamatoria pulmonaren ausencia de cambios en la apoptosis pulmonar no es

explicable, y sólo hemos podido especular para explicar estos cambios. En efecto, hubiera sido deseable abordar la medición del grado de apoptosis utilizando dos o más técnicas que indiquen la presencia de células apoptóticas.

El diseño del análisis ha incluido en general la comparación de las determinaciones en el grupo sometido a V_T elevado con las determinaciones del grupo sometido a V_T bajo. No se incluyeron determinaciones en muestras procedentes de un grupo no ventilado. La limitación en este caso consiste en que es posible que el grupo (V_T bajo) presente cambios en comparación con el grupo no ventilado que permitan valorar mejor los hallazgos en los dos grupos de ventilación mecánica. Es decir, que la ventilación mecánica con V_T bajo se asocie con un daño (aunque quizás leve), que habría que reconocer mediante la comparación con un grupo no ventilado. De hecho, sólo para el caso de las determinaciones de la expresión de TLR-4 por Western blot se incluyó un grupo no ventilado, comprobándose en efecto que el grupo sometido a V_T bajo presentaba un aumento de la expresión de TLR-4 en comparación con el grupo no ventilado.

Debido a la obligada limitación de los recursos, no hemos podido abordar todavía los mecanismos implicados en el cross-talk pulmón-intestino, en la interacción epitelio intestinal-bacterias del lumen intestinal, o en la caracterización más extensa (incluyendo mediaciones de otras citoquinas, y una descripción más detallada del perfil de citoquinas pro- versus anti-inflamatorias) de la respuesta del sistema inmune innato al insulto de la ventilación mecánica con V_T elevado.

**VI. Capítulo 3:
RELACIÓN ENTRE LA
PRESIÓN PICO DE LA
VÍA AEREA Y LOS
EFECTOS DE LA
VENTILACIÓN
MECÁNICA Y LA DDS**

1. Resumen

Objetivos

Estudiar la relación entre la presión pico de la vía aérea sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica con V_T Alto.

Métodos

Ratas macho Sprague-Dawley, peso 300-350 gr, recibieron DDS (polimixina y tobramicina en agua) o placebo (vehículo) 24 horas antes de recibir ventilación mecánica durante 2,5 horas. Los grupos de estudio en el presente capítulo estaban determinados por la estrategia ventilatoria administrada ($V_T=9\text{ml/kg} + \text{PEEP}=5\text{cmH}_2\text{O}$ [V_T Bajo, control] o con $V_T=25\text{ml/kg} + \text{PEEP}=0\text{cmH}_2\text{O}$ [V_T alto, VILI]), el tratamiento con DDS (tratamiento con DDS o tratamiento con vehículo) y el valor de la PIP al inicio del experimento ($t=0$) ($\text{PIP}<27\text{cmH}_2\text{O}$ o $\text{PIP}\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$). Los cuatro subgrupos de animales fueron: V_T Alto + VEH $\text{PIP}<27\text{cmH}_2\text{O}$, V_T Alto +VEH $\text{PIP}\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$, V_T Alto + DDS $\text{PIP}<27\text{cmH}_2\text{O}$, V_T Alto + DDS $\text{PIP}\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$. Al final del periodo de ventilación los animales fueron sacrificados mediante exanguinación, y se obtuvieron muestras de sangre arterial para la determinación de gasometría y congelación para las posteriores determinaciones bioquímicas y concentraciones de IL-1 β , IL-6, MCP-1, MIP-2, TNF- α (ELISA) y endotoxina.

Se obtuvieron muestras de suero y tejidos (pulmonar e intestinal) para la determinación de la concentración tisular de IL-6, MCP-1, MIP-2 TNF- α , CCR2, CXCR2 (Elisa) y la expresión de los genes correspondientes (RT-PCR).

Se realizó lavado broncoalveolar (LBA) para la cuantificación de IgM y proteínas totales.

El pulmón izquierdo se fijó para su posterior estudio histológico.

Todos los procedimientos siguieron los principios de animal de laboratorio (EU 86/609/CEE24-11, RD 1201/2005 BOE 10-10, ley 32/2007 BOE 7-11).

Se compararon los grupos mediante ANOVA factorial analizando los efectos de la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en las condiciones de ventilación mecánica con V_T Bajo y ventilación mecánica con V_T elevado.

Resultados

Efectos de la VM

Las ratas que recibieron V_T alto con valor de PIP basal ($\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$) en comparación con aquellas que presentaban PIP basal ($<27\text{cmH}_2\text{O}$) mostraron hipotensión, disminución de la distensibilidad pulmonar, hipoxemia, signos de daño sistémico, así como aumento de la concentración de proteínas e IgM en el LBA, de apoptosis, de la concentración tisular de TNF- α , MCP-1, IL-1- β así como un aumento de la expresión

de genes de IL-6 y MCP-1, y alteraciones histológicas consistentes con la presencia de daño pulmonar agudo (presencia de membranas hialinas).

La ventilación mecánica con V_T elevado con valor de PIP basal baja (\leq PIP 27cmH₂O) no altera los niveles de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 Y IL-1 β , en comparación con las de PIP basal elevada (\geq PIP 27 cmH₂O).

En el tejido intestinal, las ratas con valor de PIP basal (\geq 27 cmH₂O), en comparación con las de PIP basal (< 27 cmH₂O), se encontró una mayor concentración (aunque no alcanzado la significación estadística) de TNF- α , MIP-2 y MCP-1 y una mayor expresión de genes MIP-2 y CXCR2.

Efecto del tratamiento con DDS

El tratamiento con DDS en los animales que recibieron ventilación mecánica con V_T elevado con valor PIP basal <27cmH₂O en comparación con el grupo no tratado no se asoció a ningún cambio de la presión arterial, distensibilidad pulmonar, intercambio gaseoso, concentración de IgM o proteínas en LBA.

En el tejido pulmonar se observó una mayor concentración de IL-6 , en comparación con el grupo no tratado con DDS, y una menor expresión génica (no significativa de MIP-2).

En el suero, el tratamiento con DDS se asoció con una disminución de la concentración de TNF- α en comparación con el grupo no tratado.

En el tejido intestinal, los animales tratados con DDS mostraron una respuesta inflamatoria atenuada (menor concentración aunque estadísticamente no significativa de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1) y no hubo cambios en la expresión de genes.

El tratamiento con DDS en los animales que recibieron ventilación mecánica con V_T elevado con valor PIP basal \geq 27cmH₂O en comparación con el grupo no tratado se asoció con una atenuación de la elevación de la R_{AW} y un aumento de la permeabilidad alveolocapilar y de la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar (menor elevación de la concentración tisular de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1).

En el suero, el tratamiento de la DDS atenúa la respuesta inflamatoria (disminuye el TNF- α y IL-6).

En el tejido intestinal, el tratamiento con DDS mostró una menor concentración de IL-6, y una menor expresión de genes CXCR2 y MIP-2.

Conclusiones

Los efectos nocivos de la ventilación mecánica con V_T elevado se aprecian sólo en los animales que presentan un valor elevado de PIP al inicio del experimento. Sólo en este grupo con PIP elevada se demuestran los efectos beneficiosos del tratamiento con DDS.

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

1. Estudiar la relación entre la presión de la vía aérea sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica con VT elevado sobre:

La mecánica respiratoria

La función pulmonar

La hemodinamia

La afectación de otros órganos

La respuesta inflamatoria, apoptótica, expresión de TLR-4 pulmonar

La respuesta inflamatoria sistémica

La respuesta inflamatoria intestinal

2. Estudiar la relación entre la presión de la vía aérea y los efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica sobre:

La mecánica respiratoria

La función pulmonar

La hemodinamia

La respuesta inflamatoria, apoptótica, expresión de TLR-4 pulmonar.

La respuesta inflamatoria sistémica

La respuesta inflamatoria intestinal

3. Material y Métodos

Determinación del valor de PIP en $t=0$ que define dos fenotipos de acuerdo a la respuesta de la ventilación mecánica

Durante el curso de los experimentos se hizo la observación de que entre el grupo de animales sometidos a V_T elevado, algunos presentaban daño cardiovascular y pulmonar (manifestado como hipotensión e hipoxemia) tras el período de ventilación mecánica, mientras que otros animales no presentaban daño. Una vez realizado el examen histológico de las muestras de tejido pulmonar, se comprobó que aquellos animales que presentaban una peor evolución durante el tiempo de la ventilación

mecánica (hipotensión e hipoxemia) también presentaban mayor daño histológico pulmonar.

Parecen, pues, definirse dos fenotipos determinados por el grado de susceptibilidad a la ventilación mecánica. En nuestro conocimiento, no se ha señalado este fenómeno previamente en la literatura. Denominaremos a ambos fenotipos (caracterizados por una diferente respuesta al mismo insulto) “susceptible” y “resistente”.

Asimismo, se apreció que los animales que desarrollaban cambios cardiovasculares y pulmonares durante el tiempo de ventilación mecánica con V_T elevado presentaban valores de PIP al inicio del tiempo de ventilación mecánica mayores que los animales que no desarrollaban esos cambios. En efecto, al aumentar el V_T al inicio del experimento ($t=0$), todos los animales presentan subsiguientemente un esperado aumento de la PIP. Sin embargo, los animales susceptibles a la ventilación mecánica presentaban en $t=0$ (antes del inicio del insulto) unos valores de PIP mayores que los animales resistentes.

Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que los efectos de la ventilación mecánica en general sobre la respuesta inflamatoria y, por tanto, los efectos beneficiosos de la DDS, podrían ser más marcados en aquellos animales que desarrollan mayor grado de daño tras la ventilación mecánica (susceptibles *versus* resistentes). Por eso analizamos el efecto de la ventilación mecánica y de la DDS (sobre las mismas variables analizadas en el capítulo 1) en relación con el valor inicial ($t=0$) de PIP. Para ello se compararon los cambios inducidos por la ventilación mecánica y por la DDS en el grupo sometido a V_T Bajo, el grupo sometido a V_T elevado y que presenta una PIP baja en $t=0$, y el grupo sometido a V_T elevado y que presenta un valor de PIP alta en $t=0$.

Aunque resultó evidente para el experimentador el valor de PIP en $t=0$ que discrimina los animales que subsiguientemente, tras el período de ventilación mecánica, desarrollarán daño (susceptibles *versus* resistentes a los efectos de la ventilación mecánica), se siguió una metodología objetiva para determinar el valor de PIP que caracteriza a ambos grupos de animales.

Para ello se calculó el área bajo la curva ROC de los valores de PIP ($t=0$) para diagnosticar el grado de daño histológico pulmonar medido por el score de daño pulmonar. Este score asigna una puntuación de 0 a 4 en relación al grado de daño histológico. Puesto que el cálculo de área bajo la curva ROC requiere que la variable diagnóstica sea dicotómica, se calcularon áreas bajo la curva ROC con todas las opciones de dicotomizar el daño pulmonar (score de 0 a 4), considerando las siguientes opciones: (1) score 0 versus score 1, 2, 3, 4; (2) score 0,1 versus 2, 3, 4; (3) score 0,1,2 versus 3,4 (la opción score 0, 1, 2, 3 versus 4 no fue considerado pues ningún caso presentó un score de 4). Se averiguó la opción de clasificación del daño pulmonar de forma dicotómica que se asociaba con una mayor área bajo la curva. En esa opción, se identificó el valor concreto de PIP ($t=0$) que se asocia con una mejor sensibilidad y especificidad (el valor cuya suma sensibilidad + especificidad es mayor). Este valor fue utilizado para definir los dos fenotipos de acuerdo con la respuesta a la

ventilación mecánica (i.e, clasificar a los animales sometidos a V_T elevado en dos grupos: susceptibles y resistentes).

La asignación del score histológico se realizó de acuerdo al criterio del número de membranas hialinas identificadas en 100 campos observados: ausencia de membranas hialinas en 1 y 8 campos, score 0 y membranas hialinas entre 25-76, score 1.

Otros métodos

Los métodos para alcanzar los presentes objetivos coinciden con los descritos en el capítulo 2 para las determinaciones de las variables respiratorias y hemodinámicas, de la concentración de las citoquinas, de la expresión génica, y del análisis histológico.

Se compararon las variables en los grupos sometidos a ventilación con V_T Bajo y ventilación mecánica con V_T elevado (con PIP elevada y PIP baja en $t=0$).

4. Resultados

Determinación del valor de PIP en $t=0$ que define dos fenotipos de acuerdo con la respuesta a la ventilación mecánica (Tabla 1, 2 y 3. Figura 1)

Se calculó el área bajo la curva ROC de los valores de PIP ($t=0$) para diagnosticar el grado de daño histológico pulmonar medido por el índice de daño pulmonar considerando todas las opciones para categorizar la variable de forma dicotómica ((1) score 0 versus score 1, 2, 3, 4; (2) score 0,1 versus 2, 3, 4; (3) score 0, 1, 2 versus 3, 4. El área bajo la curva ROC de las diferentes opciones (1,2 y 3) se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

La tercera opción (score 0, 1, 2 versus 3,4) presentaba la mayor área bajo la curva ROC. Por tanto, se decidió clasificar a los animales de acuerdo con el valor de PIP que se asocia con una mejor sensibilidad y especificidad (el valor cuya suma sensibilidad + especificidad es mayor) en esta opción. Este valor resultó ser 26.5 cmH₂O. Por otro lado, este valor (de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del daño histológico pulmonar) fue el mismo para los otros modelos clasificatorios.

Así pues, se definieron dos nuevos grupos (dentro de los animales que recibieron V_T elevado) para analizar los efectos de la ventilación mecánica y de la DDS: aquellos con $PIP < 27$ cmH₂O y aquellos con $PIP \geq 27$ cm H₂O.

En realidad el área bajo la curva ROC del modelo 2 y 3 son idénticas.

Tabla 1. Modelo 1, Área $0,943 \pm 0,024$ (índice 0 versus 1, 2, 3 y 4)

	Sensibilidad	1-Especificidad	Especificidad	S+E
13	1	1	0	1
14,5	1	0,881	0,119	1,119
15,5	1	0,763	0,237	1,237
16,5	1	0,644	0,356	1,356
17,5	1	0,576	0,424	1,424
18,5	1	0,475	0,525	1,525
19,5	1	0,39	0,61	1,61
20,5	1	0,322	0,678	1,678
21,5	1	0,237	0,763	1,763
22,5	1	0,203	0,797	1,797
23,5	1	0,153	0,847	1,847
24,5	0,7	0,102	0,898	1,598
25,5	0,65	0,085	0,915	1,565
26,5	0,65	0,051	0,949	1,599
27,5	0,5	0,051	0,949	1,449
28,5	0,4	0,034	0,966	1,366
29,5	0,25	0	1	1,25
31,5	0,1	0	1	1,1
34	0	0	1	1

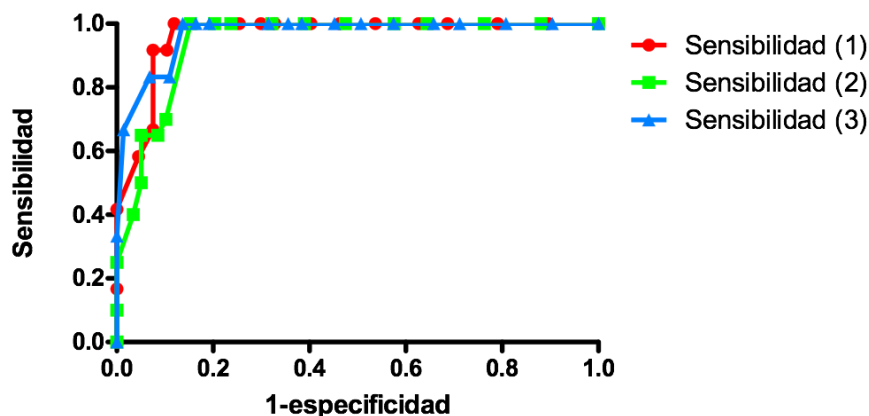
Tabla 2. Modelo 2, área $0,963 \pm 0,024$ (índice 0, 1 y 2 versus 3 y 4)

	Sensibilidad	1-Especificidad	Especificidad	S+E
13	1	1	0	1
14,5	1	0,896	0,104	1,104
15,5	1	0,791	0,209	1,209
16,5	1	0,687	0,313	1,313
17,5	1	0,627	0,373	1,373
18,5	1	0,537	0,463	1,463
19,5	1	0,463	0,537	1,537
20,5	1	0,403	0,597	1,597
21,5	1	0,328	0,672	1,672
22,5	1	0,299	0,701	1,701
23,5	1	0,254	0,746	1,746
24,5	1	0,119	0,881	1,881
25,5	0,917	0,104	0,896	1,813
26,5	0,917	0,075	0,925	1,842
27,5	0,667	0,075	0,925	1,592
28,5	0,583	0,045	0,955	1,538
29,5	0,417	0	1	1,417
31,5	0,167	0	1	1,167
34	0	0	1	1

Tabla 3. Modelo 3, área $0,963 \pm 0,024$ (índice 0, 1 y 2 versus 3 y 4)

	Sensibilidad	1-Especificidad	Especificidad	S+E
13	1	1	0	1
14,5	1	0,904	0,096	1,096
15,5	1	0,808	0,192	1,192
16,5	1	0,712	0,288	1,288
17,5	1	0,658	0,342	1,342
18,5	1	0,575	0,425	1,425
19,5	1	0,507	0,493	1,493
20,5	1	0,452	0,548	1,548
21,5	1	0,384	0,616	1,616
22,5	1	0,356	0,644	1,644
23,5	1	0,315	0,685	1,685
24,5	1	0,192	0,808	1,808
25,5	1	0,164	0,836	1,836
26,5	1	0,137	0,863	1,863
27,5	0,833	0,11	0,89	1,723
28,5	0,833	0,068	0,932	1,765
29,5	0,667	0,014	0,986	1,653
31,5	0,333	0	1	1,333
34	0	0	1	1

Figura 1. Correlación de la Sensibilidad y la (1-especificidad) de los modelos 1, 2 y 3



Por tanto, los grupos de estudio en el presente capítulo se determinaron de acuerdo a la estrategia ventilatoria administrada (V_T mecánica con V_T Bajo y ventilación mecánica con V_T elevado), el tratamiento con DDS (tratamiento con DDS o tratamiento con vehículo) y el valor de la PIP al inicio del experimento ($t=0$) ($PIP < 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ o $PIP \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$).

Grupo 1: V_T Alto + vehículo (V_T Alto + VEH)

- Subgrupo 1: V_T Alto + VEH $PIP < 27$
- Subgrupo 2: V_T Alto + DDS $PIP \geq 27$

Grupo 2: V_T Alto + DDS

- Subgrupo 3: V_T Alto + DDS $PIP < 27$
- Subgrupo 4: V_T Alto + DDS $PIP \geq 27$

Relación entre la PIP ($t=0$ min) y los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la PAM (Fig. 3 y tabla 4)

Como se indicó en el capítulo 2, la PAM disminuyó en todos los grupos analizados, alcanzando la significación estadística sólo en el caso de los animales sometidos a V_T elevado y tratados con DDS.

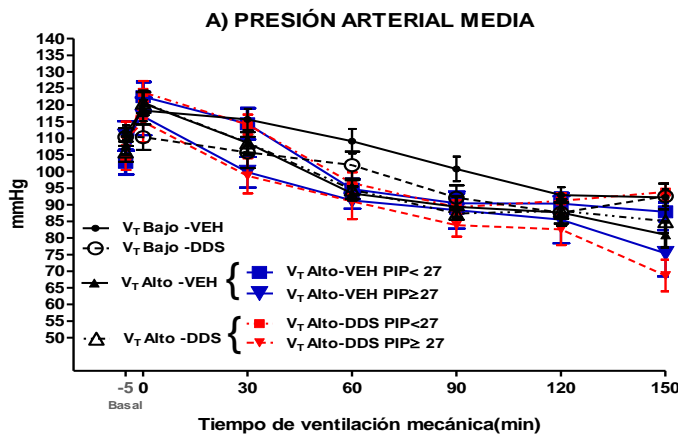
Sin embargo al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de la PIP basal encontramos que el delta de PAM (diferencia entre el valor inicial y el valor final) era mayor en que en el grupo sometido a ventilación con V_T Bajo sólo en el grupo sometido a ventilación a ventilación mecánica con V_T elevado y PIP elevada,

pero no en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado y PIP baja, alcanzando la significación estadística sólo en los animales tratados con DDS.

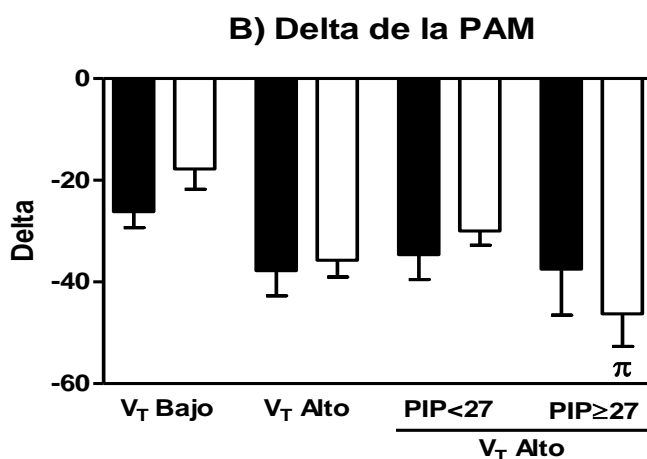
En resumen:

- (a) la aplicación de V_T elevado se asocia con una disminución progresiva de la PAM (como se indicó en el capítulo 2)
- (b) esta disminución de la PAM asociada a la aplicación de la ventilación mecánica con V_T elevado se aprecia sólo en aquellos animales con PIP basal elevada
- (c) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la PAM.

Figura 2. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la PAM



A. Evolución de la presión arterial media



B. El Delta indica la diferencia entre $t=0$ y el $t=150$ min
 $\pi p < 0.05$ vs V_T Bajo + DDS

■ + VEH
 □ + DDS

Tabla 4. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la presión arterial media (mmHg)

V_T	Tratamiento	t=0min	t=150min	Delta
V_T Bajo	VEH	118±14,4	92±11,2 ¶	-26±14,1
	DDS	110±17,1	93±17,3 ¶	-18±17,9
V_T Alto	VEH	120±16,2	82±17,3 ¶	-38±22,8
	DDS	120,8±14	85,1±16 ¶	-35,7±14,8 π
V_T Alto PIP<27cmH ₂ O	VEH	123±14,7	88±9,3 ¶	-35±16,2
	DDS	124±12,3	94±9,3 ¶	-30±10
V_T Alto PIP≥27cmH ₂ O	VEH	111±14	75±21,9 ¶	-41±28,9
	DDS	115±16,2	69±12,6 ¶	-46±17 π

El Delta indica la diferencia entre el t=0 y t=150 min. Los valores son la media ±SD. Se aplicó ANOVA de una vía; test de comparación múltiple Bonferroni:

πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS

Para la comparación entre t=0 y t=150 min se aplicó el t-test: ¶p<0.05 vs t=0

Efectos sobre los cambios de la mecánica respiratoria

Nuestro segundo objetivo fue estudiar la relación entre la presión pico de la vía aérea y los efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por VM sobre la mecánica respiratoria.

Presión pico de la vía aérea (Fig.3, tabla 5)

Como se indicó en el capítulo 2, la PIP aumentó en los grupos sometidos a V_T elevado.

Sin embargo, al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de PIP basal, encontramos que el delta de PIP (diferencia entre el valor inicial y valor final) era mayor en los grupos con PIP≥27cmH₂O, en comparación con el delta del grupo sometido a V_T Bajo. Además, el delta del grupo V_T Alto con PIP≥27cmH₂O, en comparación con el delta del grupo sometido a V_T Bajo. Además, el delta grupo V_T Alto con PIP≥27cmH₂O fue también mayor que el delta del grupo V_T Alto según la PIP basal (<27cmH₂O o ≥27cmH₂O).

No hubo diferencias entre los cambios de la PIP en relación al tratamiento con DDS, ni considerando al grupo V_T elevado globalmente, ni separando el grupo de V_T elevado según la PIP basal (<27cmH₂O o ≥27cmH₂O).

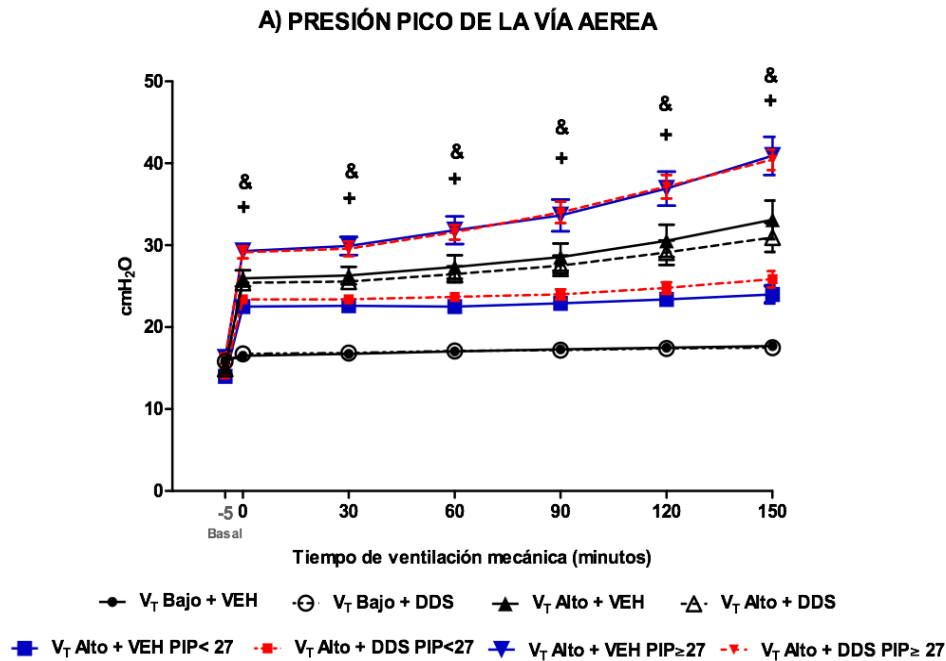
En resumen:

(a) La aplicación de V_T elevado se asoció con una elevación de la PIP (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);

(b) Este efecto de la elevación de la PIP se aprecia sólo en los animales que en momento inicial del experimento presentan una PIP≥27 cmH₂O;

(c) El tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica (V_T Alto) sobre la PIP.

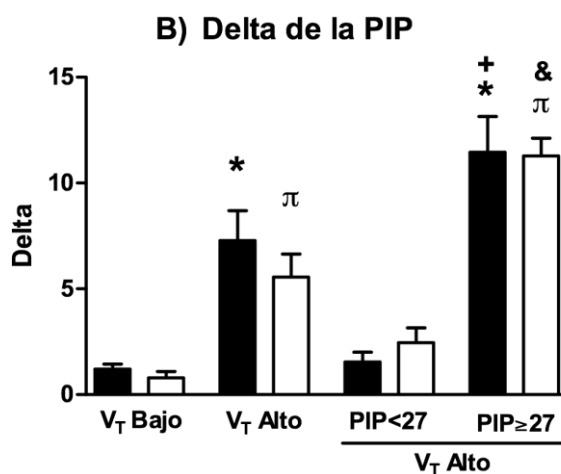
Figura 3. Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la Ventilación mecánica.



A) Relación de la PIP sobre los cambios de la ventilación mecánica:
 V_T Alto + VEH PIP < 27 + p < 0.05 frente a
 V_T Alto + VEH PIP > 27

Relación entre la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica:

V_T Alto + PIP ≥ 27 + DDS & p < 0.05 frente a V_T Alto + VEH PIP < 27 + DDS



B) El Delta indica la diferencia entre t=0 y t=150 min. Se aplicó ANOVA de una vía; test de comparación múltiple *Bonferroni*, el valor de p se refiere a la comparación entre los delta de los cuatro grupos:

* p < 0.05 vs V_T Bajo + VEH
 π p < 0.05 vs V_T Bajo + DDS
 + p < 0.05 vs V_T Alto PIP < 27
 & p < 0.05 vs V_T Alto PIP < 27 + DDS

Tabla 5. Relación de la Presión pico (cmH₂O) y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la ventilación mecánica

V _T	Tratamiento	t=0	t=150	Delta
V _T Bajo	VEH	17±1,9	18±1,6 (¶)	1±1,1
	DDS	17±2,2	18±1,7	1±1,3
V _T Alto	VEH	26±4,3	33±10,4 (¶)	7±6,5 (*)
	DDS	25,4±3,3	31±7,9 (¶)	5,6±5,6 (π)
V _T Alto PIP<27cmH ₂ O	VEH	23±2,0	24±3,2	2±1,5
	DDS	23,4±1,7	25,8±2,5 (¶)	2,5±2,5
V _T Alto PIP≥27cmH ₂ O	VEH	30±2,8	42±6,2 (¶)	11±5,6 (*) (+)
	DDS	29±2,0	40,4±3,3 (¶)	11,3±2,2(π)&)

El Delta indica la diferencia entre t=0 y t=150 min. Los valores son la media ±SD. Se aplicó ANOVA de una vía; test de comparación múltiple Bonferroni:

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH; πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS;

+p<0.05 vs V_T Alto PIP<27; &p<0.05 vs V_T Alto PIP<27 +DDS

¶p<0.05 vs t=0.

Distensibilidad dinámica (compliance) (Fig.4, tabla 6)

Como se indicó en el capítulo 2, la C_{DYN} disminuyó en los grupos sometidos a V_T elevado.

Sin embargo, al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de la PIP basal, encontramos que el delta de C_{DYN} (diferencia entre el valor inicial y final) era diferente del grupo sometido a ventilación con V_T Bajo sólo en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado y PIP basal elevada, pero no en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado y PIP basal baja.

No hubo diferencias en los cambios de la C_{DYN} en relación al tratamiento con DDS, ni considerando al grupo V_T elevado globalmente, ni separando el grupo de V_T elevado según la PIP basal (<27 cm H₂O ó ≥ 27 cm H₂O).

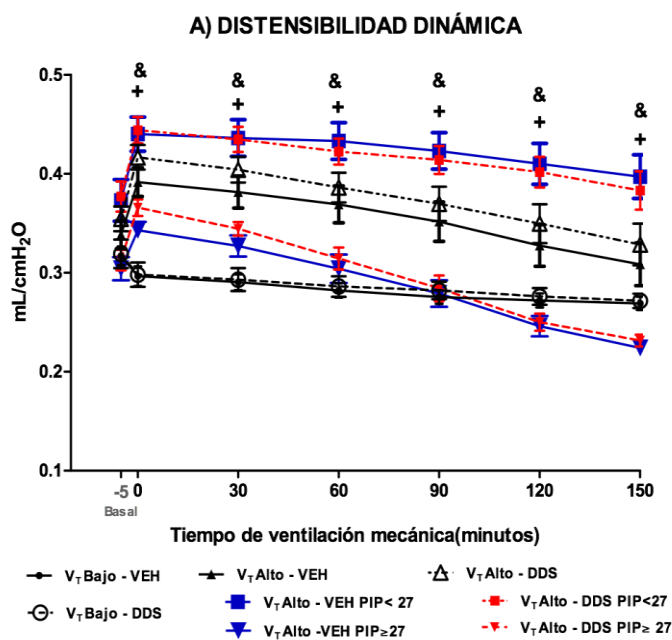
En resumen:

La aplicación de V_T elevado se asoció con una disminución de la distensibilidad (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);

(a) este efecto de la disminución de la distensibilidad se aprecia sólo en los animales que en momento inicial del experimento presentan una $PIP \geq 27$ cmH₂O;

(b) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la distensibilidad.

Figura 4. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en distensibilidad pulmonar



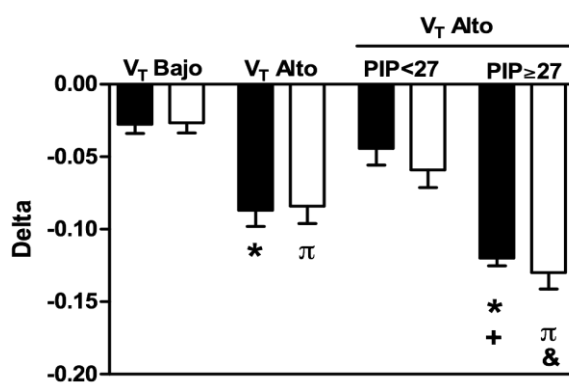
(A) Relación de la distensibilidad sobre los cambios de la ventilación mecánica:

V_T Alto + VEH PIP < 27 + p < 0.05 frente a V_T Alto + VEH PIP > 27

Relación entre la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica:

V_T Alto + PIP ≥ 27 + DDS & p < 0.05 frente a V_T Alto + VEH PIP < 27 + DDS

B) Delta de la Distensibilidad



(B) El Delta indica la diferencia entre t=0 y t=150 min. Se aplicó ANOVA de una vía; test de comparación múltiple *Bonferroni*, el valor de p se refiere a la comparación entre los delta de los cuatro grupos:

* p < 0.05 vs V_T Bajo + VEH

π p < 0.05 vs V_T Bajo + DDS

+ p < 0.05 vs V_T Alto + VEH PIP < 27

& p < 0.05 vs V_T Alto + DDS PIP < 27

Tabla 6. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en distensibilidad pulmonar (ml/cmH₂O)

V _T	Tratamiento	t=0	t=150	Delta
V _T Bajo	VEH	0,30±0,04	0,27±0,03 (¶)	-0,03±0,03
	DDS	0,30±0,06	0,27±0,03	-0,03±0,03
V _T Alto	VEH	0,39±0,06	0,30±0,10 (¶)	-0,09±0,04 (*)
	DDS	0,42±0,06	0,33±0,10 (¶)	-0,08±0,05 (π)
V _T Alto PIP<27cmH ₂ O	VEH	0,44±0,05	0,39±0,06	-0,04±0,03
	DDS	0,44±0,05	0,39±0,08 (¶)	-0,06±0,04
V _T Alto PIP≥27cmH ₂ O	VEH	0,34±0,03	0,22±0,02 (¶)	-0,12±0,02 (*) (+)
	DDS	0,37±0,02	0,23±0,02 (¶)	-0,13±0,03 (π) (&)

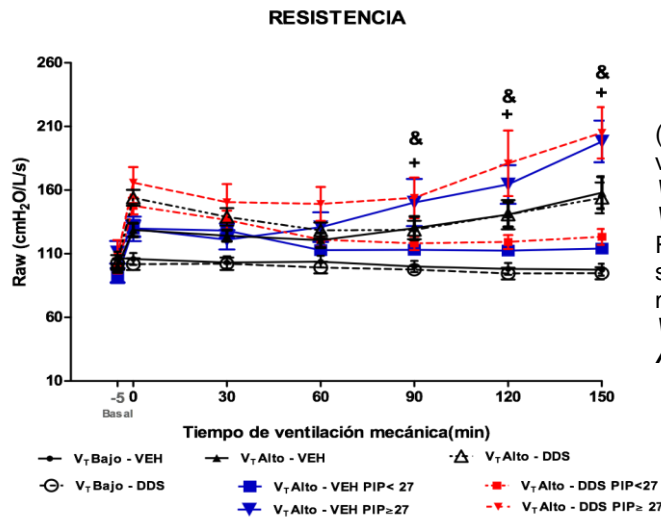
El Delta indica la diferencia entre t=0 y t=150 min. Los valores son la media ±SD. Se aplicó ANOVA de una vía; test de comparación múltiple Bonferroni: *p<0.05 vs V_T Bajo + VEH; πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS; +p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27; &p<0.05 vs V_T Alto + DDS PIP<27 ¶p<0.05 vs t=0

Resistencia de la vía aérea (Fig. 5, tabla 7)

Como se indicó en el capítulo 2, la R_{AW} aumentó durante el período de ventilación mecánica con V_T elevado, en comparación con el V_T Bajo. Este efecto fue atenuado por el tratamiento con DDS, observándose tan sólo en el grupo que no fue tratado con DDS.

Sin embargo, al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de PIP basal, encontramos que el delta de R_{AW} (diferencia entre el valor inicial y valor final) era mayor sólo en los grupos con PIP≥27 cmH₂O, en comparación con el delta del grupo sometido a V_T Bajo. Además el delta del grupo V_T elevado con PIP≥27 cmH₂O fue también mayor que el delta del grupo V_T elevado con PIP<27cmH₂O.No hubo diferencias en los cambios de R_{AW} en relación al tratamiento con DDS.

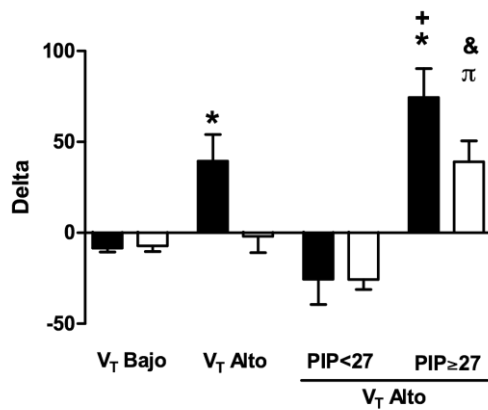
Figura 5. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la resistencia de la vía aérea



(A) Relación de la PIP sobre los cambios de la ventilación mecánica:
V_T Alto + VEH PIP < 27 +p < 0.05 frente a **V_T Alto + VEH PIP > 27**

Relación entre la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la ventilación mecánica:
V_T Alto + PIP ≥ 27 + DDS &p < 0.05 frente a **V_T Alto + VEH PIP < 27 + DDS**

B) Delta de la Resistencia



B) El Delta indica la diferencia entre t=0 y t=150 min. Se aplicó ANOVA de una vía; test de comparación múltiple *Bonferroni*, el valor de p se refiere a la comparación entre los delta de los cuatro grupos:

- *p < 0.05 vs V_T Bajo + VEH
- πp < 0.05 vs V_T Bajo + DDS
- +p < 0.05 vs V_T Alto + VEH PIP < 27
- &p < 0.05 vs V_T Alto + DDS PIP < 27

Tabla 7. Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios inducidos por la VM en la resistencia (cm H₂O/L/s)

V _T	Tratamiento	t=0	t=150	Delta
V _T Bajo	VEH	106±20,7	97±20,9	-8±9,2
	DDS	102±20,6	95±21,3	-7±13,9
V _T Alto	VEH	129±23,8	167±58,8 (¶)	39±58,9
	DDS	154±27,7	148,6±55,7	-1,9±39,5 (*)
V _T Alto PIP<27cmH ₂ O	VEH	130±20,1	116±12,9	-26±39,1
	DDS	148±23,8	118±20,3 (¶)	-26±19,0
V _T Alto PIP≥27cmH ₂ O	VEH	130±29,0	204±48,6 (¶)	74±45,3 (*) (+)
	DDS	166±32,3	204±58,3	39±30,5 (π) (&)

El Delta indica la diferencia entre t=0 y t=150 min. Los valores son la media ±SD. Se aplicó ANOVA de una vía; test de comparación múltiple Bonferroni:

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH; πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS;
 +p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27; &p<0.05 vs V_T Alto + DDS PIP<27
 ¶p<t=0

Efectos sobre los cambios en la función pulmonar

Intercambio gaseoso (Tabla 8; figura 6 y 7)

Como se indicó en el capítulo 2, la PaO₂/FiO₂ disminuyó en los animales sometidos a V_T elevado (la diferencia entre t=150 min y t=0 min alcanzó la significación estadística sólo en el grupo tratado con DDS).

Sin embargo, al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de PIP basal, encontramos que el delta de PaO₂/FiO₂ (diferencia entre el valor inicial y valor final) era mayor que en el grupo sometido a ventilación con V_T Bajo sólo en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado y PIP basal ≥27cmH₂O (y no en el grupo con PIP basal <27cmH₂O).

Las gasometrías se determinaron en muestras de sangre obtenidas antes del inicio de la ventilación mecánica (t=-5 min, basal), y al finalizar el experimento (t=150min) (Tabla 6 y 7)

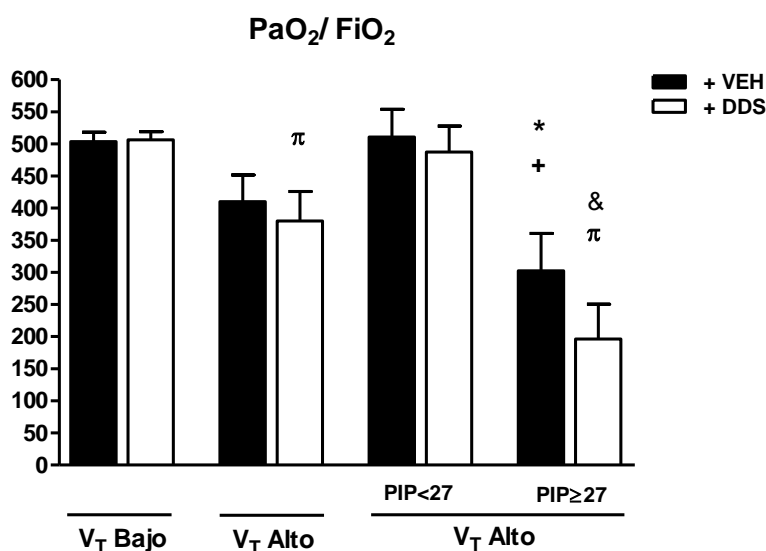
En resumen:

(a) La aplicación de V_T elevado se asoció con una disminución aunque no significativa de la PaO_2/FiO_2 (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);

(b) este efecto de la disminución de la PaO_2/FiO_2 se aprecia sólo en los animales que en momento inicial del experimento presentan una $PIP \geq 27$ cmH₂O;

(c) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica (V_T Alto) sobre la PO_2/FiO_2

Figura 6. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la ratio de la presión parcial de oxígeno a nivel arterial (PaO_2) y la fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) a t=150 minutos



La ratio entre la presión parcial de oxígeno a nivel arterial (PaO_2) y la fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) fueron evaluados al finalizar el periodo de la ventilación mecánica.

* $p < 0,05$ frente a V_T Bajo + VEH

+ $p < 0,05$ frente a V_T Alto + VEH $PIP < 27$

$\pi p < 0,05$ frente a V_T Bajo + DDS

& $p < 0,05$ frente a V_T Alto + DDS $PIP < 27$

Tabla 8. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en el intercambio gaseosos (mmHg)

		PaO ₂		
V _T	Tratamiento	t=0	t=150	Delta
V _T Bajo	VEH	171±20,24	176±22,71	5±13,21
	DDS	173±17,05	178±19,08	5±10
V _T Alto	VEH	166±14,82	144±65,24	-22±64,15
	DDS	170,3±12,18	133,1±69,66(¶)	-37,3±63,56
V _T Alto PIP<27cmH ₂ O	VEH	163±16,10	179±50,32	15±41,90
	DDS	173,5±8,61	170,6±48,89	-2,9±46,73
V _T Alto PIP≥27cmH ₂ O	VEH	168±14,54	106±57,65 (¶)	-62±59,33(+)(*)
	DDS	164±15,94	68,7±50,29(¶)	-96±41,3 (π)(&)

El valor delta indica la diferencia entre t=0 y el t=150 min. Los valores son la media ± SD

El valor p se refiere:

La comparación entre el momento final (t=150 min) y el momento inicial (t=0) (t-test)

¶p<0.05 vs t=0

La comparación entre los delta (ANOVA de una vía, test: comparación múltiple Bonferroni)

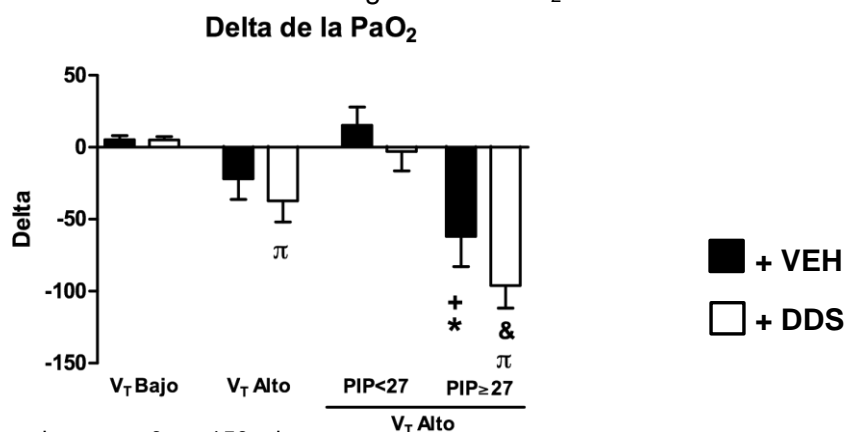
*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH

+p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27

πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS

&p<0.05 vs V_T Alto +DDS PIP<27

Figura 7. Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la ventilación mecánica en el intercambio gaseoso: PaO₂



El Delta indica la diferencia entre t=0 y t=150 min

La comparación entre los Delta (ANOVA de una vía, test de comparación múltiple Bonferroni)

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH

+p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27

πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS

&p<0.05 vs V_T Alto + DDS PIP

Tabla 9. Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la ventilación mecánica en el intercambio gaseoso: pH y PaCO₂

A) pH

V _T	Tratamiento	t=0min	t=150min	Delta
V_T Bajo	VEH	7,4±0,07	7,4±0,07	-0,01±0,07
	DDS	7,4±0,06	7,4±0,06	-0,01±0,05
V_T Alto	VEH	7,4±0,07	7,3±0,07	-0,1±0,09
	DDS	7,4±0,06	7,4±0,05	-0,04±0,08
V_T Alto PIP<27cmH₂O	VEH	7,38±0,06	7,34±0,06	-0,03±0,07
	DDS	7,39±0,06	7,36±0,05	-0,03±0,09
V_T Alto PIP≥27cmH₂O	VEH	7,37±0,08	7,31±0,06	-0,06±0,10
	DDS	7,41±0,06	7,34±0,03	-0,07±0,06

B) PaCO₂ (mmHg)

V _T	Tratamiento	t=0min	t=150min	Delta
V_T Bajo	VEH	28±6,90	28±6,0	0,20±4,55
	DDS	25±4,56	25±4,26	-1±4,09
V_T Alto	VEH	29±5,43	31±4,33	3±6,55
	DDS	27,9±6,18	31±4,10	3,1±5,88
V_T Alto PIP<27cmH₂O	VEH	31±5,40	31±4,31	0,45±5,77
	DDS	29,1±6,67	31,3±3,28	2,2±6,46
V_T Alto PIP≥27cmH₂O	VEH	27±4,79	32±4,70	5±7,27
	DDS	25,9±5,05	30,6±5,50	4,7±4,72

Abreviaciones: PaCO₂, presión parcial de dióxido de carbono arterial. Las medidas se realizaron en una situación basal (después de 30 minutos de estabilización post quirúrgica ventilado con V_T bajo) y tras un periodo de estrategia ventilatoria 150 minutos.

Tabla 10. Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la ventilación mecánica en el intercambio gaseoso: HCO_3^- y PaCO_2

A) HCO_3^- (mmol/L)

V_T	Tratamiento	t=0min	t=150min	Delta
V_T Bajo	VEH	17±1,61	16±1,65	-0,3±1,23
	DDS	17,1,93	16±1,97	-1±2,37
V_T Alto	VEH	17±1,95	16±2,21	-1±1,74
	DDS	17,2±2,34	17,2±2,49	0,1±1,51
V_T Alto PIP<27cmH₂O	VEH	18±1,91	17±1,74	-1±1,26
	DDS	17,6±1,95	17,7±2,25	0,1±1,35
V_T Alto PIP≥27cmH₂O	VEH	16±1,06	16±1,4	1±1,04
	DDS	16,4±2,93	16,4±2,81	-0,1±1,89

B) Lactato (mmol/L)

V_T	Tipo de sustancia	t=0min	t=150min	Delta
V_T Bajo	VEH	2,4±1,03	1,0±0,33	-1,4±0,99
	DDS	2,3±1,06	1,0±0,18	-1,2±1,04
V_T Alto	VEH	2,2±0,93	1,2±0,86	-1,0±1,13
	DDS	2,2±0,99	1,1±0,61	-1,1±0,72
V_T Alto PIP<27cmH₂O	VEH	1,82±0,75	0,84±0,28	-0,98±0,82
	DDS	1,86±0,79	0,91±0,37	-0,95±0,80
V_T Alto PIP≥27cmH₂O	VEH	2,59±1,07	1,23±0,63	-1,36±1,11
	DDS	2,73±1,22	1,67±0,79	-1,36±0,58

Abreviaciones: HCO_3^- , bicarbonato arterial.

Las medidas se realizaron en una situación basal (después de 30 minutos de estabilización post quirúrgica ventilado con V_T bajo) y tras un periodo de estrategia ventilatoria 150 minutos.

Como se describió en el capítulo 2, la aplicación de V_T elevado no se asoció con cambios significativos en el pH, $PaCO_2$, bicarbonato y lactato arteriales.

Al separar el grupo sometido a V_T elevado según el valor de PIP basal ($<27\text{cmH}_2\text{O}$, ó $\geq 27\text{cm H}_2\text{O}$), no se apreció ningún cambio en ninguno de los valores mencionados. Únicamente se observó una tendencia (que no alcanzó la significación estadística) a un menor pH en el grupo sometido a V_T elevado con $PIP \geq 27\text{cmH}_2\text{O}$ (en comparación con el grupo sometido a ventilación con V_T Bajo).

El tratamiento con DDS no modificó ninguno de los cambios observados, ni en el grupo sometido a V_T elevado (considerado globalmente), ni en los grupos sometidos a V_T elevado con $PIP < 27\text{ cm H}_2\text{O}$ o V_T elevado con $PIP \geq 27\text{cmH}_2\text{O}$.

Alteraciones en la permeabilidad alveolo capilar

Proteínas totales en el lavado bronco alveolar

Como se describió en el capítulo 2, la aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor concentración de proteínas totales en el LBA en comparación con los animales que recibieron V_T Bajo. La diferencia entre V_T elevado y V_T Bajo alcanzó la significación estadística sólo en los animales no tratados con DDS.

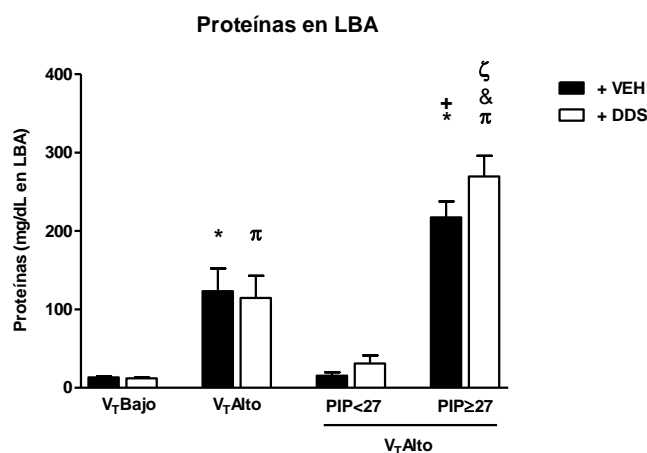
Al separar el grupo sometido a V_T elevado según el valor de PIP basal ($<27\text{cm H}_2\text{O}$, o $\geq 27\text{cm H}_2\text{O}$), se apreció que el efecto de V_T elevado sobre la concentración de proteínas en el LBA es significativo sólo en los animales con PIP basal $\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$. La concentración de proteínas en el LBA era también mayor en los animales sometidos a V_T alto elevado PIP basal $\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$ que en los animales sometidos a V_T elevado PIP basal $< 27\text{cmH}_2\text{O}$.

La concentración de proteínas totales en el LBA en animales sometidos a V_T elevado con $PIP \geq 27\text{cm H}_2\text{O}$ fue mayor en el grupo tratado con DDS que en el grupo no tratado con DDS.

En resumen:

- (a) la aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor concentración de proteínas en el LBA, en comparación con la aplicación de V_T bajo (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);*
- (b) este efecto sobre la concentración de proteínas se aprecia sólo en los animales que en el momento inicial del experimento presentan una PIP basal $\geq 27\text{ cm H}_2\text{O}$;*
- (c) el tratamiento con DDS aumenta la permeabilidad alveolo capilar asociado a los animales que en el momento inicial del experimento presentan una PIP basal $\geq 27\text{cmH}_2\text{O}$.*

Figura 8. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la concentración de proteínas en el LBA a los 150 minutos



Efecto de la DDS sobre la permeabilidad alveolocapilar

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH

+p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27

πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS

&p<0.05 vs V_T Alto + DDS PIP<27

ζp<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP≥27

Ratio LBA/suero de la concentración de proteínas (Tabla 11 y figura 19)

Como se describió en el capítulo 2, la aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor ratio entre la concentración de proteínas en el LBA y la concentración de proteínas en el suero, en comparación con los animales que recibieron V_T bajo. La diferencia entre V_T elevado y V_T bajo alcanzó la significación estadística sólo en los animales no tratados con DDS.

Al separar el grupo sometido a V_T elevado según el valor de la PIP basal (<27cmH₂O, ó ≥27cm H₂O), se apreció que el efecto del V_T elevado sobre la ratio de la concentración de proteínas es significativo sólo en los animales con PIP basal ≥27cm H₂O. La ratio de la concentración de proteínas era también mayor en los animales con V_T elevado con PIP≥27cm H₂O que en los animales con V_T elevado con PIP<27 cmH₂O.

El tratamiento con DDS no afectó al aumento de la ratio de la concentración de proteínas inducido por la ventilación mecánica en los animales con PIP≥27 cm H₂O.

En resumen:

(a) La aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor ratio entre la concentración de proteínas LBA/suero, en comparación con la aplicación de un V_T Bajo (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria)

(b) este efecto sobre la ratio se aprecia sólo en los animales que en el momento inicial del experimento presentan una PIP basal ≥ 27 cm H₂O.

(c) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la ratio LBA/suero de la concentración de proteínas.

Tabla 11. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la concentración de proteínas a los 150 minutos

	Tratamiento	V_T Bajo	V_T Alto	V_T Alto PIP <27cm H ₂ O	V_T Alto PIP ≥ 27 cm H ₂ O
Suero	VEH	658±97,40	301,98±37,85 *	300,98±032,36 *	336,96±080,89
(mg/dL)	DDS	302±45,23	713,8±92,29 π	763,70±113,80 #	621,17±176,13 π
LBA	VEH	13±1,11	123±29,94 *	15,53±04,60	217,4±1,68 + *
(mg/dL)	DDS	12±0,95	114±29,04 π	31,00±0,60	269,5±28,6 £ & π
Ratio	VEH	3,09±0,64	38,68±2,02	5,77±1,43	76±25±16,44 + *
(%)	DDS	5,66±0,80	29,32±11,66	6,30±2,20	72,06±25,81 &π

Abreviatura: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo. LBA, Lavado broncoalveolar.

Ratio (%), ratio de concentración de proteínas entre el LBA y el suero.

Estadística: ANOVA de una vía. Comparación múltiple de *Bonferroni*.

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH

+p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27

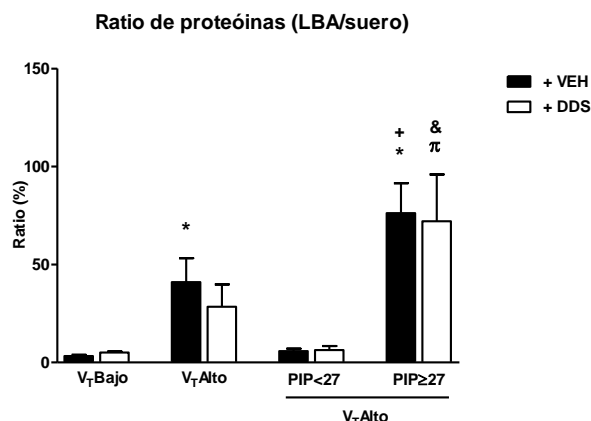
πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS

ζp<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27

&p<0.05 vs V_T Alto ++DDS PIP<27

#p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27

Figura 9: Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la ratio de proteínas a los 150 minutos



Abreviatura: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo. LBA, Lavado broncoalveolar. Ratio(%), ratio de concentración de proteínas entre el LBA y el suero. Estadística: ANOVA de una vía. Comparación múltiple de *Bonferroni*.

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH
 +p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27
 πp<0.05 vs V_T Bajo + DDS
 &p<0.05 vs V_T Alto + DDS PIP<27

Concentración de IgM en el lavado broncoalveolar (Fig. 12)

Como se describió en el capítulo 2, la aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor concentración de IgM en el LBA en comparación con la aplicación de V_T bajo. El tratamiento con DDS atenúo este aumento.

Al separar el grupo sometido a V_T elevado según el valor de PIP basal (<27 cm H₂O, ó ≥27cm H₂O), se apreció que el efecto de V_T elevado sobre la concentración de IgM en el LBA se aprecia tanto en el grupo con PIP basal <27 cm H₂O como en el grupo con PIP basal ≥ 27 cm H₂O. Sin embargo, el aumento es mayor en los animales con PIP basal ≥ 27 cm H₂O que en los animales con PIP basal <27 cm H₂O.

El tratamiento con DDS no afectó al aumento de la concentración de IgM en el LBA.

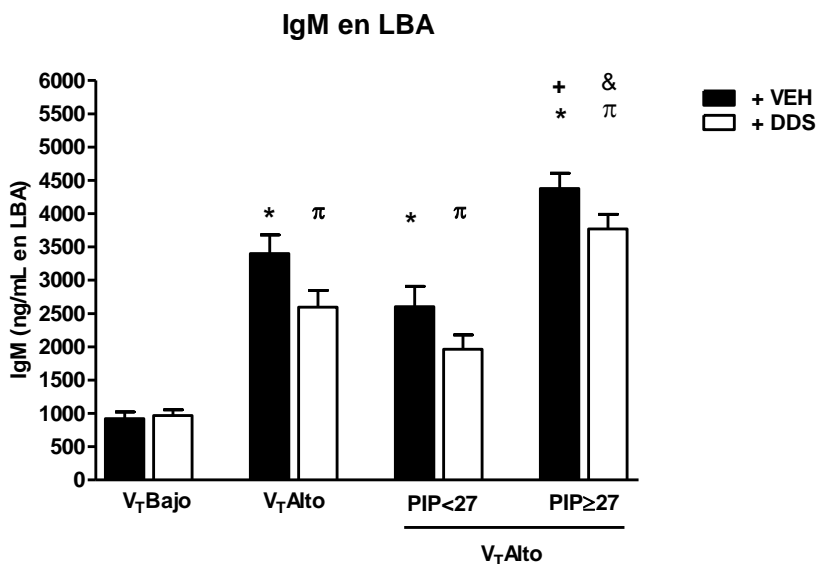
En resumen:

(a) la aplicación de V_T elevado se asoció con una mayor concentración de IgM en el LBA, en comparación con la aplicación de un V_T bajo (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);

(b) este efecto sobre la concentración de IgM se aprecia en todos los animales sometidos a V_T elevado, pero es mayor en aquellos que presentan inicialmente una PIP ≥27 cm H₂O en comparación con los que presentan PIP <27 cm H₂O;

(c) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre la concentración de IgM en el LBA

Figura 10: Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la VM en la concentración de IgM a los 150 minutos



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo
 La permeabilidad alveolo-capilar se evaluó cuantificando la concentración de Ig M en el LBA.
 Estadística: ANOVA de una vía Comparación múltiple de *Bonferroni*.
 * $p < 0.05$ vs V_T Bajo + VEH
 + $p < 0.05$ vs V_T Alto + VEH PIP < 27
 π $p < 0.05$ vs V_T Bajo + DDS
 & $p < 0.05$ vs V_T Alto + DDS PIP < miRNA 27a-5p

Efectos sobre la histología pulmonar (Figura 11)

Como se describió en el capítulo 2, la aplicación de V_T elevado se asoció con un mayor score de daño pulmonar en comparación con la aplicación de V_T Bajo. El tratamiento con DDS no modificó ese aumento.

Al separar el grupo sometido a V_T elevado según en valor de la PIP basal (<27 cmH₂O, ó ≥27 cmH₂O), se apreció que el efecto del V_T elevado sobre el índice de daño pulmonar se observa sólo en el grupo con PIP basal ≥ 27 cm H₂O y que el aumento en el grupo V_T elevado con PIP basal ≥ 27 cm H₂O es mayor que el aumento en el grupo V_T elevado con PIP basal < 27 cmH₂O.

El tratamiento con DDS no afectó el índice de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado.

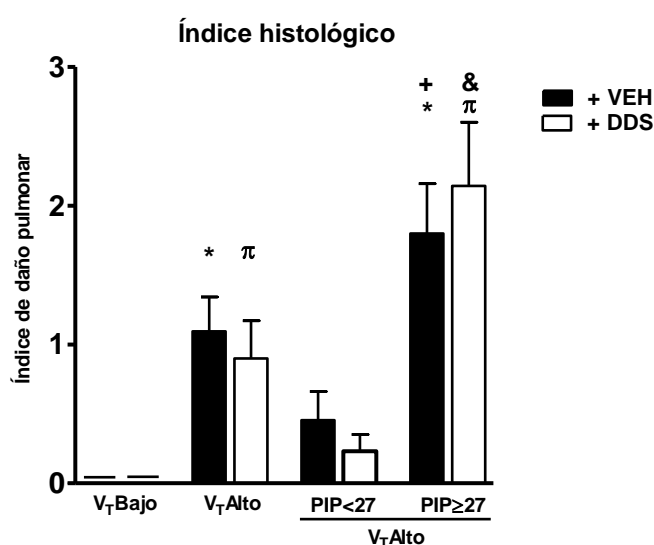
En resumen:

(a) la aplicación de V_T elevado se asoció con un mayor score de daño pulmonar, en comparación con la aplicación de un V_T bajo (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);

(b) este efecto sobre el score de daño pulmonar se aprecia sólo en los animales que en el momento inicial del experimento presentan una PIP basal ≥ 27 cm H_2O ;

(c) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre el score de daño pulmonar.

Figura 13: Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la VM en el parénquima pulmonar a los 150 minutos.



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo. MH, Membranas Hialinas
 Estadística: ANOVA de una vía. Comparación múltiple de *Bonferroni*

* $p < 0.05$ vs V_T Bajo + VEH

+ $p < 0.05$ vs V_T Alto + VEH PIP < 27

π $p < 0.05$ vs V_T Bajo + DDS

& $p < 0.05$ vs V_T Alto + DDS PIP < 27

La equivalencia del índice de daño pulmonar se detalla en el apartado de material y métodos.

Repercusión a otros órganos (Tabla 9)

Como se describió en el capítulo 2, la aplicación del V_T elevado se asoció con una mayor concentración sérica de glucosa, y de la actividad sérica de LDH, CK, GOT, y GTP, que alcanzó la significación estadística sólo en el grupo no tratado con DDS (para la GOT) o sólo en el grupo tratado con DDS (para el caso de la glucosa, LDH, y GTP).

Al separar el grupo sometido a V_T elevado según el valor de la PIP Basal (<27cm H_2O , ó ≥ 27 cm H_2O), se apreció que el efecto del V_T elevado sobre los diferentes cambios

bioquímicos era observado sólo en los animales que presentaban una PIP basal ≥ 27 cm H₂O.

El tratamiento con DDS no afectó a los diferentes cambios bioquímicos inducidos por la ventilación mecánica con V_T elevado.

En resumen:

(a) la aplicación de V_T elevado se asocia con signos de daño celular sistémico no específico de tejido (elevación de enzimas intracelulares) (como se indicó en el capítulo 2)

(b) el efecto de la ventilación mecánica con V_T elevado sobre los cambios bioquímicos analizados se aprecia sólo en los animales que presentan una PIP basal ≥ 27 cm H₂O;

(c) el tratamiento con DDS no afecta a los cambios bioquímicos inducidos por la ventilación mecánica.

Tabla 12. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en diferentes variables a los 150 minutos

	Tratamiento	V _T Bajo	V _T Alto	V _T Alto PIP <27cm	V _T Alto PIP ≥ 27 cm
Glucosa (mg/dl)	VEH	109 \pm 5,1	119 \pm 7,6	105 \pm 4,5	136 \pm 17 *
	DDS	101 \pm 3,5	129,7 \pm 6 π	121 \pm 8,0	145 \pm 8,5 π
Creatinina (mg/dl)	VEH	0,6 \pm 0,02	0,6 \pm 0,10	0,5 \pm 0,03	0,7 \pm 0,10
	DDS	0,7 \pm 0,10	0,5 \pm 0,040 π	0,5 \pm 0,02	0,6 \pm 0,08
LDH (IU/L)	VEH	320 \pm 31	698 \pm 117	531 \pm 119	728 \pm 113
	DDS	401 \pm 51	846 \pm 212 π	574 \pm 115	1390 \pm 594 π &
CK (IU/L)	VEH	597 \pm 91	2042 \pm 511 *	2020 \pm 907	1877 \pm 557
	DDS	879 \pm 21	2196 \pm 31 π	1901 \pm 251	2789 \pm 857
GOT (IU/L)	VEH	83 \pm 4,60	145 \pm 19,50 *	109 \pm 8,93	161 \pm 29,30 *
	DDS	95 \pm 80	138 \pm 17	130 \pm 20,50	153,2 \pm 70
GTP (IU/L)	VEH	33 \pm 1,9	50 \pm 7,2	38 \pm 3,2	52,4 \pm 7,9 *
	DDS	35 \pm 2,2	50,4 \pm 5,4 π	42,8 \pm 5,0	63,6 \pm 11 π &

Abreviaciones: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo. LDH, lactato deshidrogenasa. CK, creatin kinasa. GOT, aspartato aminotransferasa. GTP, Alanina aminotrasferasa.

Estadística: ANOVA de una vía. Comparación múltiple de *Bonferroni*.

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH

+p<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP<27

π p<0.05 vs V_T Bajo + DDS

&p<0.05 vs V_T Alto + DDS PIP<27

Efectos sobre los cambios en la respuesta inflamatoria pulmonar: citoquinas

TNF- α

La administración de V_T elevado se asoció con una elevación de la concentración en el tejido pulmonar, que fue atenuado (la diferencia respecto al grupo que recibió V_T Bajo no alcanzó la significación estadística) mediante el tratamiento con DDS (tal como se indicó en el capítulo 2).

Al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de PIP basal (<27 cmH₂O ó ≥ 27 cmH₂O), se observó que el aumento de la concentración de la citoquina sólo se apreció en el grupo con PIP basal ≥ 27 cmH₂O, y no en el grupo con PIP <27 cmH₂O. Además el aumento medido en el grupo sometido a V_T elevado con PIP ≥ 27 cmH₂O fue mayor que el grupo sometido a V_T elevado con PIP <27 cmH₂O.

Se observó dentro del grupo sometido a V_T elevado con PIP ≥ 27 cmH₂O que los animales que recibieron tratamiento con DDS presentaban un menor concentración de la citoquina que los animales que no recibieron tratamiento con DDS.

MCP-1

La administración de V_T elevado se asoció con una elevación de la concentración en el tejido pulmonar, que fue atenuado (la diferencia respecto al grupo que recibió V_T bajo no alcanzó la significación estadística) mediante el tratamiento con DDS (tal como se indicó en el capítulo 2).

Al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de la PIP basal (<27 cm H₂O ó ≥ 27 cmH₂O), se observó que el aumento de la concentración de la citoquina sólo se apreció en el grupo con PIP basal ≥ 27 cmH₂O, y no en el grupo con PIP < 27 cm H₂O. Además el aumento medido en el grupo sometido a V_T elevado con PIP ≥ 27 cmH₂O fue mayor que el aumento en el grupo sometido a V_T elevado con PIP <27 cm H₂O.

Se observó dentro del grupo sometido a V_T elevado con PIP ≥ 27 cm H₂O una tendencia (no significativa) a una menor concentración de la citoquina en el grupo tratado con DDS en comparación con el grupo no tratado con DDS.

IL-1 β

La administración de V_T elevado se asoció con una elevación en la concentración en el tejido pulmonar, que fue atenuado (la diferencia respecto al grupo que recibió V_T bajo no alcanzó la significación estadística) mediante el tratamiento con DDS (tal como se indicó en el capítulo 2).

Al separar los grupos sometidos a V_T elevado de acuerdo con el valor de PIP basal (<27 cmH₂O ó ≥ 27 cmH₂O), se observó que el aumento de la concentración de la citoquina sólo se apreció en el grupo con PIP basal ≥ 27 cm H₂O, y no en el grupo con PIP < 27 cm H₂O. Además el aumento medido en el grupo sometido a V_T elevado con

PIP \geq 27 cmH₂O fue mayor que el aumento en el grupo sometido a V_T elevado con PIP<27 cm H₂O (al menos para el grupo tratado con DDS).

El tratamiento con DDS se asoció con una tendencia no significativa a menores concentraciones de la citoquina en el grupo que recibió V_T Bajo con PIP<27 cmH₂O.

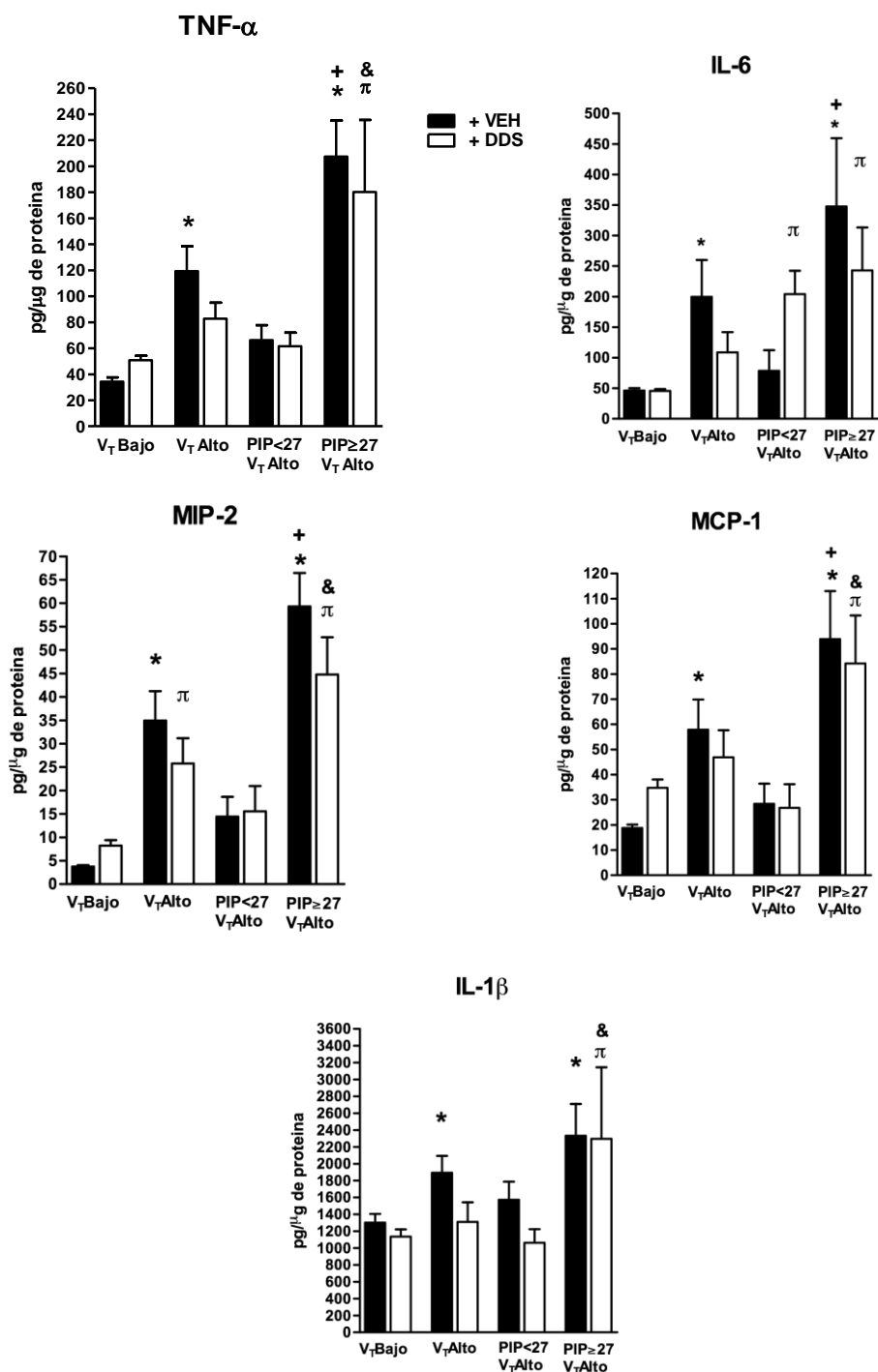
En resumen:

(a) la aplicación del V_T elevado se asocia con la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar (mayor concentración de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 e IL-1 β), cambios (al menos para TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-1 β) atenuados por el tratamiento con DDS (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);

(b) los cambios medidos en la concentración de las diferentes citoquinas se aprecian sólo en animales con PIP basal \geq 27 cmH₂O, y no en los que presentan PIP<27 cm H₂O;

(c) el tratamiento con DDS atenúa el aumento de la concentración de las diferentes citoquinas sólo en aquellos animales que presentan una PIP basal \geq 27 cm H₂O.

Figura 12. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la concentración de citoquinas en el tejido pulmonar



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo.
 Análisis estadístico: ANOVA de una vía. Test de comparación múltiple *Bonferroni*
 *p < 0,05 vs V_T Bajo + VEH;
 +p < 0,05 vs V_T Alto + VEH PIP < 27;
 πp < 0,05 vs V_T Bajo + DDS PIP < 27;
 &p < 0,05 vs V_T Alto + DDS PIP < 27;
 #p < 0,05 vs V_T Alto + VEH PIP < 27;
 ζp < 0,05 vs V_T Alto + VEH PIP \geq 27.

Efectos sobre los cambios en la respuesta inflamatoria pulmonar: expresión génica

TNF- α

La administración de V_T elevado se asoció con una elevación de la expresión del gen de TNF- α , en comparación con V_T Bajo, que se observó tanto en los grupos que presentaban PIP < 27 cm H₂O como PIP \geq 27 cmH₂O.

Se apreciaron algunas tendencias en los cambios de la expresión en relación con el tratamiento con DDS o con el valor de PIP basal, pero ninguno alcanzó significación estadística y, por tanto, no serán comentados.

IL-6

La administración de V_T elevado se asoció con una elevación de la expresión del gen de IL-6, en comparación con V_T bajo, que se observó tanto en los grupos que presentaban PIP < 27 cm H₂O como PIP \geq 27 cmH₂O

El aumento de la expresión del gen de IL-6 fue más marcado en el grupo sometido a V_T elevado con PIP \geq 27 cm H₂O que en el grupo sometido a V_T elevado con PIP < 27 cmH₂O.

No se observó ningún efecto consistente y significativo del tratamiento con DDS.

MIP-2

La administración de V_T elevado se asoció con una elevación de la expresión del gen de MIP-2, en comparación con V_T Bajo, que se observó tanto en los grupos que presentaban PIP < 27 cmH₂O como PIP \geq 27 cm H₂O.

El aumento de la expresión del gen de MIP-2 fue más marcado en el grupo sometido a V_T elevado con PIP \geq 27 cm H₂O que en el grupo sometido a V_T elevado con PIP < 27 cmH₂O.

Aunque se apreció una tendencia a una menor expresión en los animales tratados con DDS, ninguna diferencia alcanzó la significación estadística.

CXCR-2

No se apreció ningún cambio en la expresión de CXCR-2 en relación con la administración de V_T elevado, con la PIP basal, o con el tratamiento con DDS.

CCR2

No se apreció ningún cambio en la expresión de CCR2 en relación con la administración de V_T elevado, con la PIP basal, o con el tratamiento con DDS.

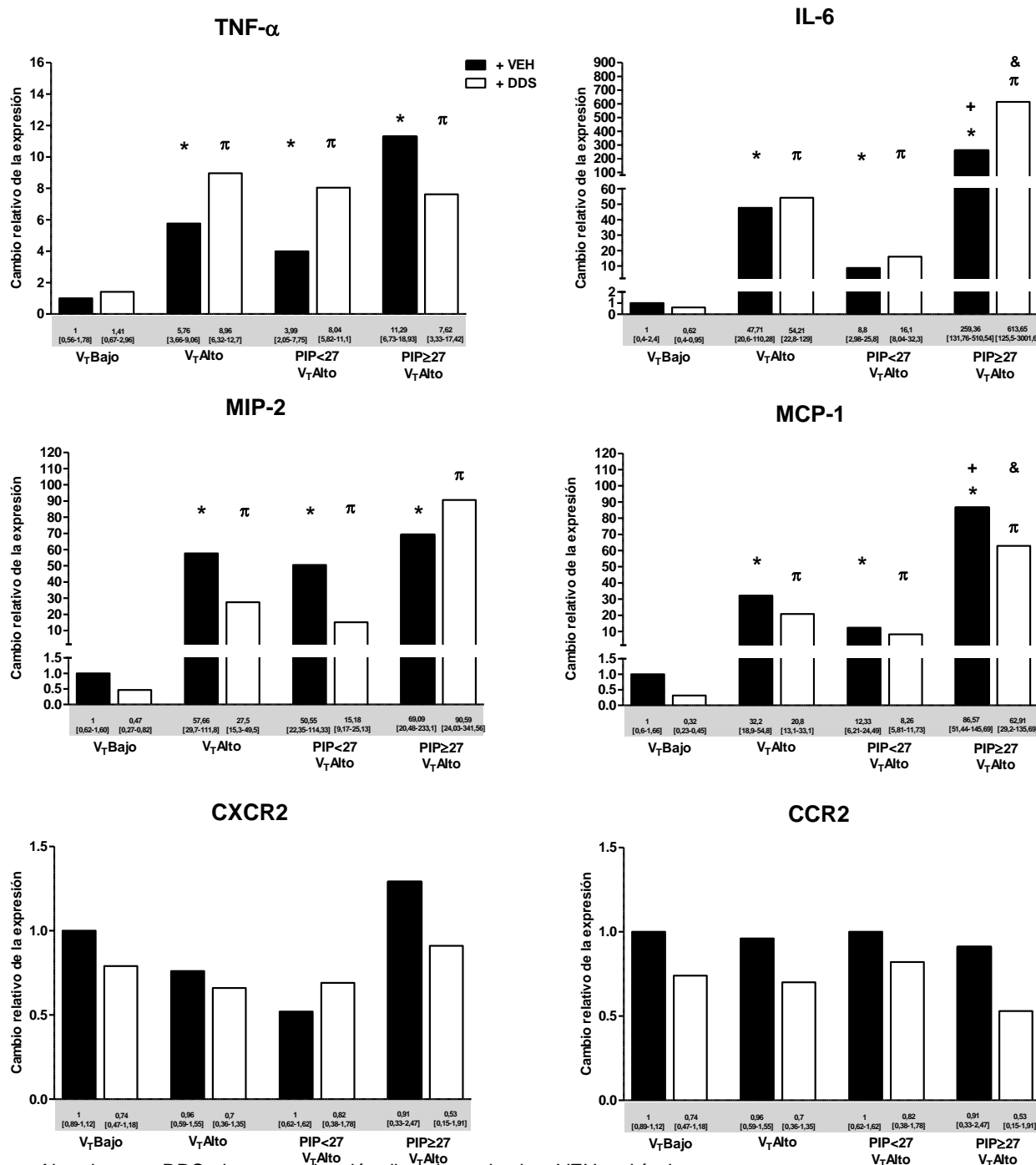
En resumen:

(a) La administración de V_T elevado se asoció con una mayor expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1) (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria);

(b) este efecto sobre la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria resulta más evidente en los animales que presentan una PIP basal ≥ 27 cm H₂O (al menos para el caso de la expresión de IL-6 y MCP-1);

(c) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica en la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria.

Figura 13. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la expresión de genes de citoquinas, quimioquinas y sus receptores en el tejido pulmonar



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva, VEH, vehículo.

Los resultados fueron analizados usando el método $\Delta\Delta C_T$.

* $p < 0,05$ vs V_T Bajo + VEH;

+ $p < 0,05$ vs V_T Alto + VEH PIP < 27;

$\pi p < 0,05$ vs V_T Bajo + DDS PIP < 27;

& $p < 0,05$ vs V_T Alto + DDS PIP < 27;

Concentración de TLR-4 en el tejido pulmonar (Figura 14)

La administración de V_T elevado se asoció con una disminución de la expresión de TLR-4 en tejido pulmonar en comparación con V_T Bajo. Esta disminución es observó tanto en los grupos que presentaban $PIP < 27$ cmH₂O como $PIP \geq 27$ cm H₂O.

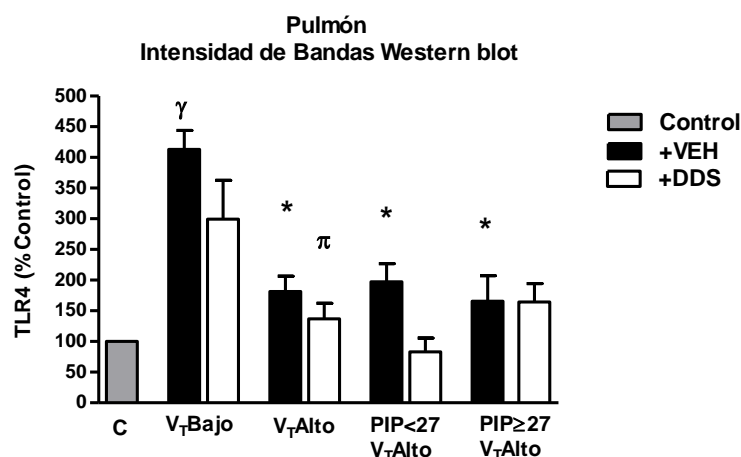
No se observó ningún efecto del tratamiento con la DDS.

En resumen:

(a) La aplicación de V_T elevado se asocia con una mayor expresión de TLR-4 en comparación con la aplicación de V_T Bajo.

(b) el tratamiento con DDS atenúa la expresión de TLR-4 en el subgrupo de animales que empieza con una PIP basal < 27 (aunque no tiene significación estadística) mas no en los animales con PIP basal ≥ 27 cm H₂O.

Figura 14. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la expresión de TLR4



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo, CONTROL, ratas no ventiladas.

Se indica la intensidad de las bandas (Western blot) de tejido pulmonar procedente de animales no ventilados (control) y animales sometidos a ventilación mecánica con V_T Bajo o V_T elevado.

Análisis estadístico: ANOVA de una vía. Test de comparación múltiple de Bonferroni.

γ $p < 0.05$ vs V_T Bajo + VEH;

* $p < 0.05$ vs V_T Bajo + VEH;

π $p < 0.05$ vs V_T Bajo + DDS $PIP < 27$.

La presión alta de la vía aérea induce apoptosis en la pared broncoalveolar (Figura 15 y 16)

La apoptosis, cuantificada mediante la técnica TUNEL (ver material y métodos) se encontraban discretamente incrementada en los animales sometidos a V_T elevado, en comparación con los animales sometidos a V_T Bajo, sin alcanzar la significación estadística.

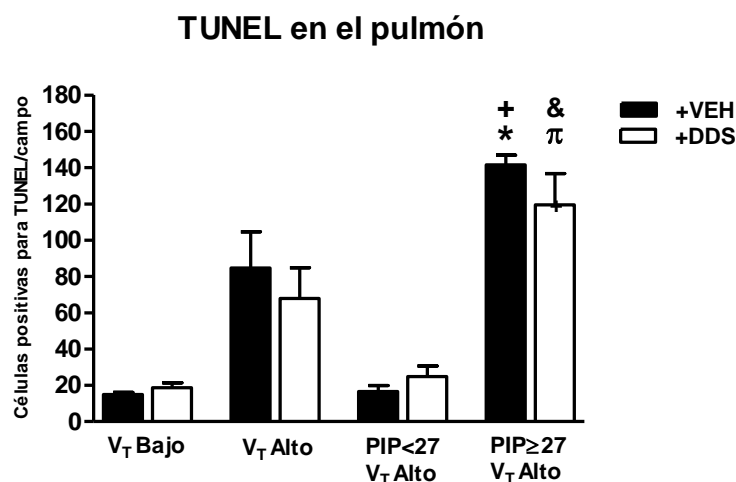
Sin embargo, al separar los animales de acuerdo con el valor de la PIP basal, se apreció aumento significativo del grado de apoptosis en el grupo que presentaba $PIP \geq 27$ cm H₂O, pero no en el grupo que presentaba $PIP < 27$ cmH₂O.

No se observó ningún efecto del tratamiento con DDS sobre el grado de apoptosis.

En resumen:

- (a) La aplicación de V_T elevado induce un aumento de la apoptosis sólo en el grupo que presentaba una PIP basal ≥ 27 cmH₂O;
- (b) el tratamiento con DDS no afecta al cambio inducido por la ventilación mecánica en el grado de apoptosis en el tejido pulmonar.

Figura 15: Cuantificación de la apoptosis en secciones de tejido pulmonar



Se indica la cuantificación de células positivas para TUNEL en cortes de pulmón.

Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo.

Análisis estadístico: ANOVA de una vía. Test de comparación múltiple *Bonferroni*.

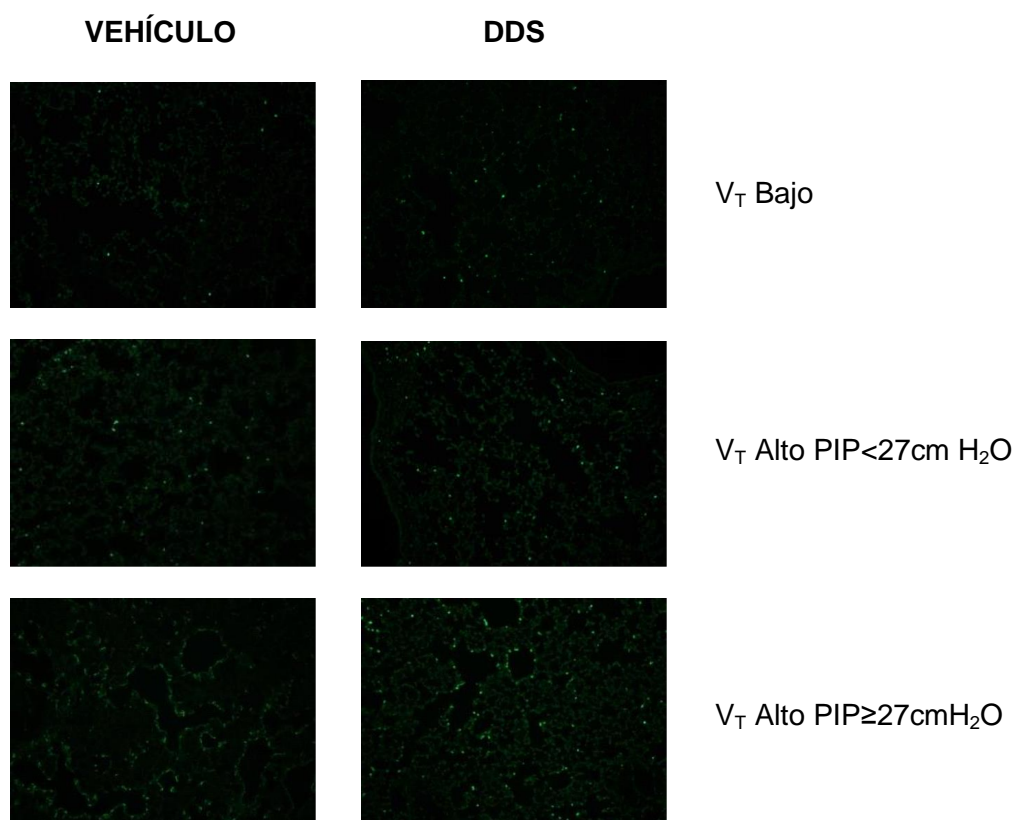
* $p < 0,05$ vs V_T Bajo + VEH;

+ $p < 0,05$ vs V_T Alto + VEH $PIP < 27$;

π $p < 0,05$ vs V_T Bajo + DDS $PIP < 27$;

& $p < 0,05$ vs V_T Alto + DDS $PIP < 27$;

Figura 16. Apoptosis a las 2,5 horas de ventilación y 24 horas después de tratamiento con DDS



Reacción TUNEL (terminal desoxynucleotidyltransferasa-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling) de secciones representativas de cortes de pulmón que corresponden a ratas sometidas a ventilación mecánica durante 2,5 horas previamente tratadas o no tratadas con DDS. Los núcleos de muchas células del parénquima pulmonar muestran signos de apoptosis lo cual se traduce en una reacción positiva para TUNEL y son visualizados como puntos verdes (aumento x200)

Respuesta inflamatoria a nivel del intestino

Concentración de citoquinas y quimioquinas en el tejido intestinal (Figura 17)

La aplicación de V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció, en comparación con la aplicación de V_T Bajo, con una menor concentración de MIP-2, mientras que no se observó ningún cambio en las citoquinas estudiadas.

Sin embargo se encontró mayor concentración TNF- α (aunque no tuvo significancia estadística) solo en el subgrupo que presentaban PIP basal ≥ 27 cmH₂O y no en los que presentaban PIP basal < 27 cmH₂O en comparación con la administración de V_T Bajo.

El subgrupo que presentaba PIP ≥ 27 cmH₂O, presentó una mayor concentración (aunque no alcanzando significación estadística) de TNF- α , MIP-2 y MCP-1 en comparación con el subgrupo que presentaba PIP basal < 27 cmH₂O.

Entre los animales tratados con DDS, la administración de V_T elevado (en comparación con el V_T Bajo) no se encontró ningún cambio de citoquinas y quimioquinas determinadas (como se indicó en el capítulo 2 de la presente memoria)

Tanto los animales que presentaban PIP basal < 27 cmH₂O como los que presentaban PIP basal ≥ 27 cmH₂O no mostraron variaciones en la concentración de citoquinas en comparación con el grupo ventilado con V_T Bajo; figura 19.

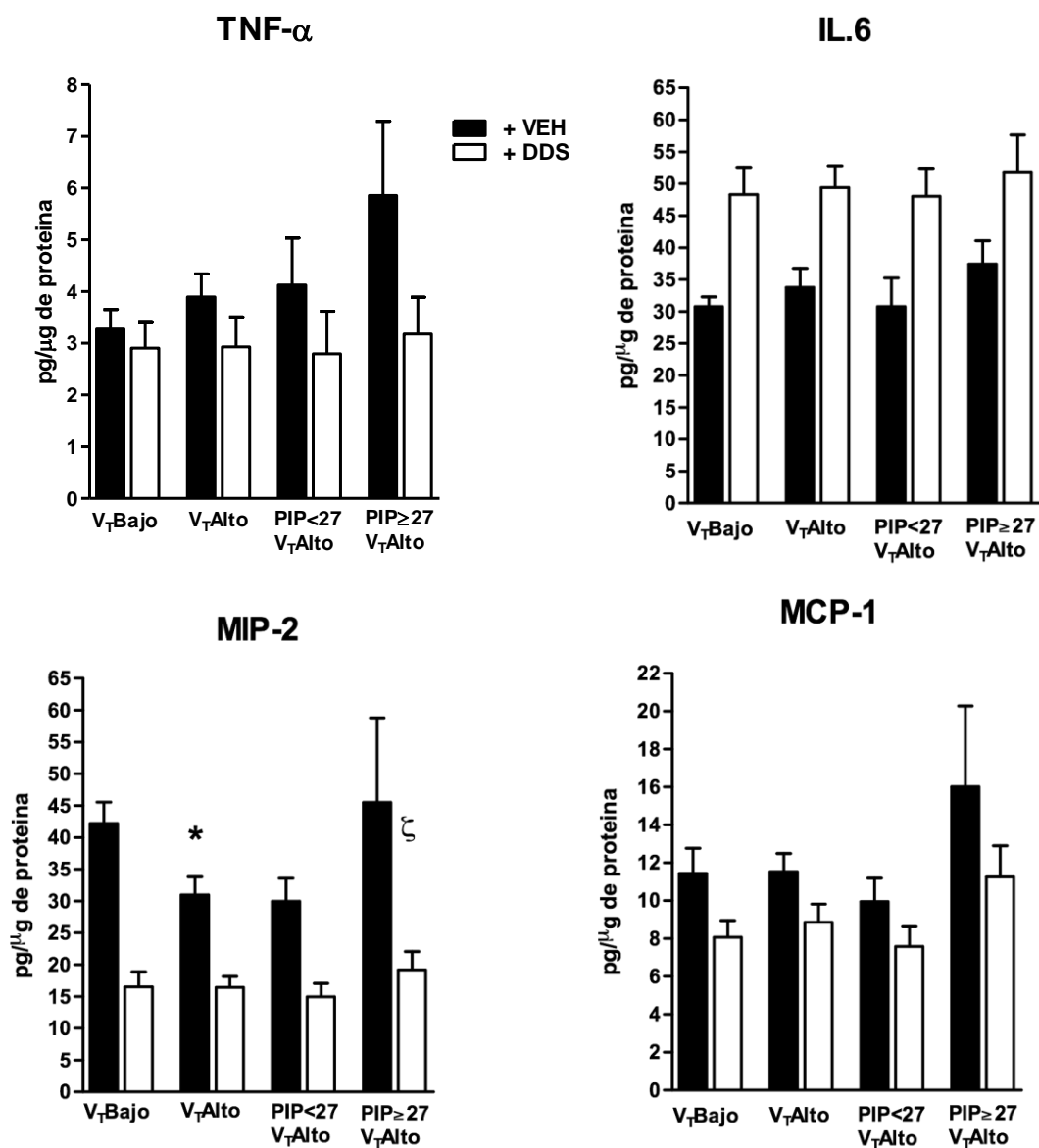
Tampoco hubo cambios en la concentración de citoquinas entre los animales que presentaban PIP basal < 27 cmH₂O y los que presentaban PIP basal ≥ 27 cmH₂O.

Sin embargo el grupo tratado con DDS que presentaba PIP ≥ 27 cmH₂O presentaba una menor concentración de MIP-2 y (aunque no de forma significativa) de TNF- α , MCP-1 en comparación con el grupo no tratado que presentaba PIP ≥ 27 cmH₂O. Sin embargo la concentración de IL-6 fue mayor y (aunque no de forma significativa).

En resumen:

- (a) *la aplicación de V_T elevado se asocia con una menor concentración de MIP-2, lo cual puede interpretarse como una respuesta antiinflamatoria en el tejido intestinal inducida por la ventilación mecánica.*
- (b) *el tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria en el tejido intestinal (menor concentración de MIP-2, TNF- α y MCP-1) asociada a la ventilación mecánica con V_T elevado (en los animales que presentan PIP basal ≥ 27 cmH₂O)*

Figura 17: Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la ventilación mecánica en la concentración de citoquinas y quimioquinas en el tejido intestinal



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo

*p<0.05 vs V_T Bajo + VEH

ζp<0.05 vs V_T Alto + VEH PIP≥27

Expresión de genes en el tejido intestinal (Figura 18)

La aplicación de V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) se asoció con una menor expresión del gen de *MIP-2*, en comparación con la administración de V_T Bajo. La expresión de otros genes analizados no se modificó por la ventilación mecánica.

El subgrupo de ratas que presentaban $PIP < 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ presentó una menor expresión de genes *IL-6*, *MIP-2* y *CXCR-2* y el subgrupo que presentaba $PIP \text{ basal} \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ presentó mayor expresión de *CXCR-2* (aunque no de forma significativa) en comparación con la administración de V_T Bajo.

El subgrupo de ratas que presentaban $PIP \text{ basal} \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ presentó una mayor expresión de genes *MIP-2*, *CXCR2* y (no de forma significativa) *IL-6* en comparación con el subgrupo de ratas que presentaron $PIP \text{ basal} < 27 \text{ cmH}_2\text{O}$.

La aplicación de V_T elevado (en ratas tratadas con DDS) se asoció con una mayor expresión del *CXCR2*, en comparación con la administración de V_T Bajo. La expresión de otros genes no se modificó por la ventilación mecánica.

El subgrupo de ratas que presentaban $PIP < 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ no presentaron cambios en la expresión de los genes analizados. Sin embargo el subgrupo de ratas que presentaban $PIP \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ presentó una mayor expresión de genes *MCP-1* y *CXCR2* en comparación con la administración de V_T Bajo.

El subgrupo de ratas que presentaban $PIP \text{ basal} \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ presentó una mayor expresión de *MCP-1* en comparación con el subgrupo de ratas que presentaron $PIP \text{ basal} < 27 \text{ cmH}_2\text{O}$.

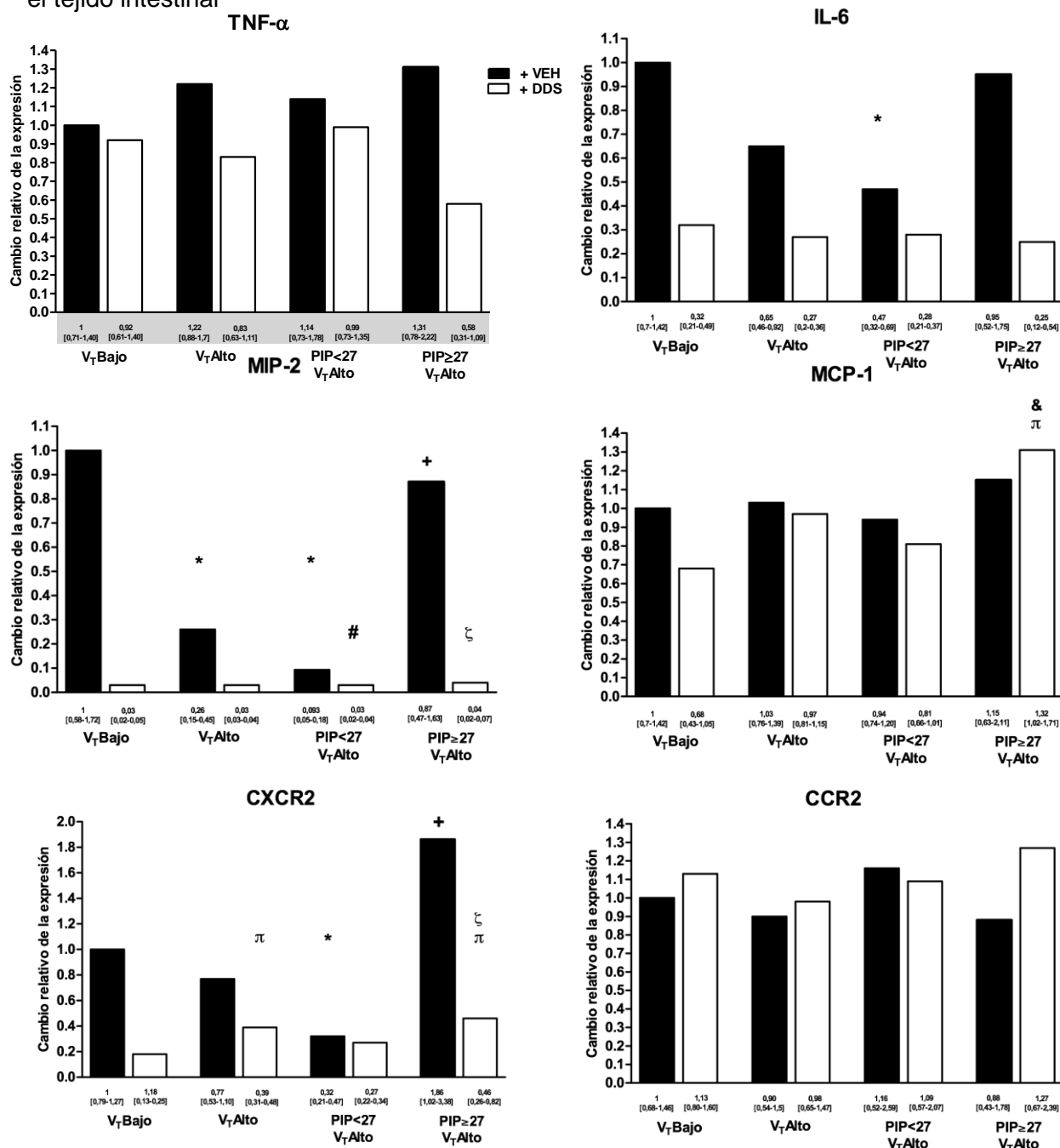
Sin embargo el grupo tratado con DDS que presentaba $PIP \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$ presentaba una menor expresión de genes *MIP-2*, *CXCR2* y (de forma no significativa) *TNF- α* y *IL-6* en comparación con el grupo no tratado que presentaba $PIP \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$.

Resumen:

(a) la aplicación de V_T elevado se asocia con una respuesta antiinflamatoria (menor expresión de *MIP-2*);

(b) la aplicación de V_T Alto (en las ratas que presentaban $PIP \text{ basal} \geq 27 \text{ cmH}_2\text{O}$), la DDS se asocia con un efecto antiinflamatorio (disminución de la expresión de los genes *MIP-2*, *CXCR2*).

Figura 18. Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la ventilación mecánica en la expresión de genes de citoquinas y quimioquinas en el tejido intestinal



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo.

Los resultados fueron analizados usando el método $\Delta\Delta CT$. El cambio de expresión es relativa al grupo V_T Bajo que no recibió la DDS. Se normalizó con RNA18s.

*p<0,05 vs V_T Bajo + VEH;

+p<0,05 vs V_T Alto + VEH PIP<27;

πp<0,05 vs V_T Bajo + DDS PIP<27;

&p<0,05 vs V_T Alto + DDS PIP<27;

#p<0,05 vs V_T Alto + VEH PIP<27;

ζp<0,05 vs V_T Alto + VEH PIP≥27

Respuesta inflamatoria a nivel sistémico (Figura 19)

La aplicación de V_T elevado (en ratas no tratadas con DDS) no indujo cambios en la concentración de ninguna de las citoquinas estudiadas en comparación con la administración de V_T Bajo.

Sin embargo se encontró mayor concentración de MIP-2 y (no con significación estadística) IL-6 y IL-1 β sólo en el subgrupo que presentaba PIP basal ≥ 27 cm H₂O, y no se encontraron cambios en la concentración de las citoquinas determinadas en los animales que presentaban PIP basal < 27 cm H₂O en comparación con la administración de V_T Bajo.

El subgrupo que presentaba PIP ≥ 27 cmH₂O, presentó una mayor concentración (aunque no alcanzando significación estadística) de IL-6, MIP-2, MCP-1 y IL-1 β en comparación con el subgrupo que presentaba PIP basal < 27 cm H₂O.

Los animales tratados con DDS presentaron al administrar V_T elevado (en comparación con V_T Bajo) una elevación en la concentración sérica de IL-6.

Los animales que presentaban PIP basal < 27 cm H₂O presentaron un aumento en la concentración de IL-6 en comparación con los tratados con V_T Bajo.

Los animales que presentaban PIP basal ≥ 27 cm H₂O no mostraron cambios significativos en comparación con los sometidos a V_T Bajo.

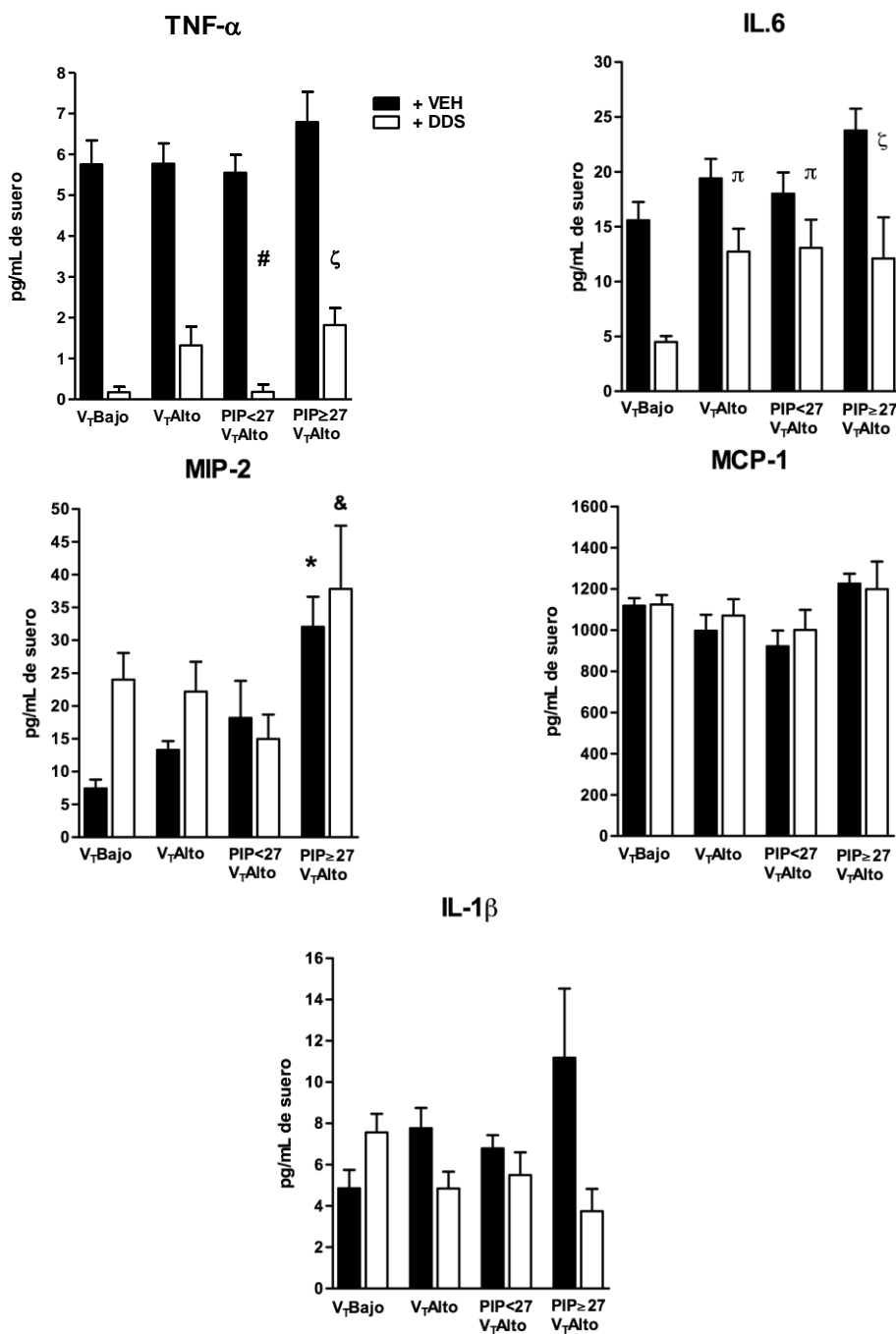
Sin embargo los animales que presentaron PIP basal ≥ 27 cmH₂O presentaron mayor concentración de MIP-2 en comparación con los animales que presentaron PIP basal < 27 cmH₂O.

El grupo tratado con DDS que presentaba PIP ≥ 27 cmH₂O presentaba una menor concentración de TNF- α y MIP-2 en comparación con el grupo no tratado con DDS que presentaba PIP ≥ 27 cmH₂O.

Resumen:

- (a) la aplicación de V_T elevado no altera los niveles de TNF- α , IL-6, MIP-, MCP-1 y IL-1 β en comparación con la aplicación de un V_T Bajo;
- (b) el tratamiento con DDS afecta al subgrupo que presentó PIP basal ≥ 27 cm H₂O, atenuando la respuesta inflamatoria (disminución de TNF- α y IL-6).

Figura 19. Relación de la PIP y los efectos de la DDS sobre los cambios modulados por la ventilación mecánica en la concentración de proteínas a nivel sistémico



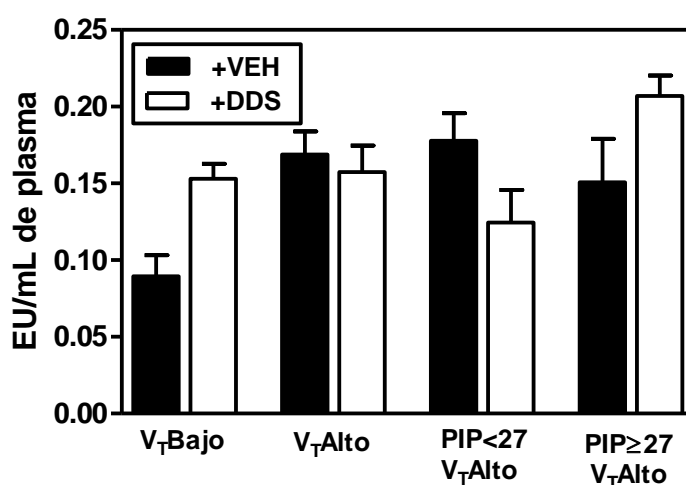
Abreviaturas DDS, descontaminación digestiva selectiva, VEH, vehículo
 Análisis estadístico: ANOVA de una vía. Test de comparación múltiple de *Bonferroni*.
 *p<0,05 vs V_T Bajo + VEH;
 +p<0,05 vs V_T Alto + VEH PIP<27;
 πp<0,05 vs V_T Bajo + DDS PIP<27;
 & p<0,05 vs V_T Alto + DDS PIP<27;
 #p<0,05 vs V_T Alto + VEH PIP<27;
 ζp<0,05 vs V_T Alto + VEH PIP≥27

Concentración de LPS en suero (Figura 20)

La aplicación de V_T elevado no indujo cambios en los niveles de LPS en comparación con la aplicación del V_T Bajo.

El tratamiento con DDS no afecta el cambio inducido por la ventilación mecánica en los niveles de LPS en plasma.

Figura 20. Relación de la PIP con los cambios inducidos por la ventilación mecánica y el tratamiento con DDS en la concentración plasmática de LPS



Abreviaturas: DDS, descontaminación digestiva selectiva. VEH, vehículo.

Análisis estadístico ANOVA de una vía. Test de comparación múltiple *Bonferroni* No hubo diferencias significativas para LPS.

5. Discusión

En el presente capítulo de la memoria (capítulo 3) se describe un análisis que sigue el mismo formato que el presentado anteriormente (capítulo 2), diferenciando ahora dos subgrupos dentro del grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado, de acuerdo al valor de PIP basal (el valor en $t=0$, justo después de aumentar el V_T asignado). Al análisis demuestra que existen dos fenotipos caracterizados por diferentes respuestas al mismo insulto (ventilación mecánica con V_T elevado). En nuestro conocimiento, no se ha descrito este fenómeno previamente en la literatura: un fenotipo susceptible y otro resistente ante la ventilación mecánica lesiva.

En el desarrollo de los experimentos se observó que los animales que desarrollaban cambios cardiovasculares y pulmonares durante el tiempo de ventilación mecánica presentaban inicialmente (antes de aplicar el insulto) valores de PIP mayores que los animales que no desarrollaban estos cambios. Al aumentar el V_T al inicio del experimento ($t=0$ min), todos los animales presentan subsiguientemente un aumento de la PIP. Sin embargo, los animales que tras el período de ventilación mecánica de 2.5 h se demostraron susceptibles a la ventilación mecánica presentaban en $t=0$ (antes del inicio del insulto) unos valores de PIP mayores que los resistentes.

Pese a que resultó claro para el experimentador el valor de la PIP en $t=0$ min que diferencia los animales que posteriormente, tras el período de ventilación mecánica, desarrollarán daño (susceptibles *versus* resistentes a los efectos de la ventilación mecánica) se calculó el área bajo la curva ROC de los valores de PIP ($t=0$ min) que presenta mayor sensibilidad y especificidad para determinar el grado de daño histológico pulmonar. Este valor resultó 26.5 cm H₂O.

De esta manera, se determinaron dos nuevos grupos (dentro de los animales que recibieron V_T elevado) para analizar los efectos de la ventilación mecánica y de la DDS: aquellos con $PIP < 27$ cm H₂O (*resistentes*) y aquellos con $PIP \geq 27$ cm H₂O (*susceptibles*).

El objetivo del análisis aquí presentado (capítulo 3) es demostrar que el daño y disfunción (cardiovascular, pulmonar, sistémico) inducido por la ventilación mecánica se manifiesta principalmente en el grupo que inicialmente presenta una PIP basal elevada, y que el efecto de la DDS descrito en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado se aprecia tan solo en el subgrupo que inicialmente presenta una PIP basal elevada. El diseño del presente estudio permite tan sólo una aproximación descriptiva, aunque muy novedosa, a la identificación de los dos fenotipos de animales caracterizados por una diferente PIP basal y una subsiguiente diferente susceptibilidad al daño inducido por la ventilación mecánica. Los mecanismos que subyacen a esta diferente respuesta no pueden ser definidos con el presente diseño. Tan sólo se presenta aquí una descripción de ambos fenotipos, aportando asimismo una discusión especulativa sobre las causas posibles de diferente susceptibilidad.

¿Por qué algunas ratas presentan PIP más elevada al inicio?

La caracterización de los dos fenotipos descansa en el hecho de que un subgrupo presenta daño cardiovascular, pulmonar y sistémico tras la aplicación de la ventilación mecánica con V_T elevado, mientras que el otro subgrupo, aún cuando es sometido al mismo insulto, no presenta ninguna lesión identificable con la presente metodología. La diferente mecánica del sistema torácico desde el inicio del experimento como lo demuestra el hecho de que la PIP basal, al aumentar el V_T desde 9 a 25 ml/kg, es diferente en ambos grupos. Las causas de esta diferente mecánica del sistema torácico pueden ser: diferencias genéticas asociadas a diferentes propiedades del sistema torácico; o bien posibles artefactos (intubación endotraqueal o insuficiente relajación neuromuscular) que expliquen una mayor PIP basal en algunos animales.

Diferencias genéticas que determinen una diferente PIP basal

Los genes son desactivados por metilación, lo que se acentúa con exposiciones medioambientales y con ciertas dietas, mientras la acetilación las activa. Algunos de estos cambios son heredados (lo que, por ejemplo, permiten crecer envejecer) y otros se presentan en el contexto de una lesión o una enfermedad. Es posible que los animales, aun cuando contengan el mismo genoma, presenten variaciones epigenéticas que les hagan más susceptibles a la ventilación mecánica. También es posible que diferentes variante genéticas expliquen una diferente susceptibilidad a la ventilación mecánica. Son conocidas variantes genéticas de genes asociadas con el desarrollo y desenlace (mortalidad y protección) de la lesión pulmonar aguda inducida por la ventilación mecánica. Estas variaciones genéticas se corresponden con reguladores moleculares específicos implicados en el desarrollo de VILI. Por ejemplo, Claudia dos Santos y cols [297] demostraron el papel del factor de transcripción 3 (ATF3). La expresión de esta proteína y su translocación al núcleo se incrementa en el pulmón después de la ventilación mecánica de ratones nativos. Ratones knock out para ATF3 muestran una mayor sensibilidad a la ventilación mecánica que se traduce en un aumento de células infiltradas y citoquinas proinflamatorias en el tejido pulmonar y en el lavado broncoalveolar, un aumento del edema pulmonar y un mayor daño pulmonar [297]. Estos autores sugieren que ATF-3 es un factor de transcripción antiinflamatorio que atenúa la inflamación inducida por la ventilación mecánica.

Posibles artefactos que determinen una diferente PIP basal

Se puede especular sobre el papel de diferentes artefactos para explicar la diferente PIP basal en ciertos animales. Por ejemplo, es posible que en algunos casos la intubación endotraqueal progrese a una posición endobronquial de forma inadvertida. Otra explicación posible es que la obstrucción inadvertida de uno de los bronquios, bien por secreciones o por un pequeño coágulo, resultando en una mayor elevación de la PIP al aumentar el V_T en comparación con otro grupo en el cual no se desarrolla esta obstrucción bronquial.

Otra explicación potencial de la diferente PIP basal de ciertos animales es la insuficiente adaptación al ventilador. En nuestro modelo los animales fueron premedicados por vía i.p. una mezcla de ketamina y diazepam, combinación que se continúa de forma continua por vía i.v. (ver material y métodos). Con este protocolo de analgesia se garantiza una sedación adecuada, no apreciándose una desincronía entre el animal y el respirador. Por otro lado, la posibilidad de una activación diafragmática por el centro respiratorio es aún menor en los casos en los que se administra un V_T tan elevado como en el grupo de ventilación mecánica con V_T elevado.

Sea la causa de una peor mecánica del sistema respiratorio una susceptibilidad genética o de cualquier otro tipo que se asocia a una menor compliance del sistema torácico, o sea un artefacto no identificado (menos probable), la conclusión de la conservación de dos fenotipos es igualmente válida: es necesario documentar en los modelos de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica una elevación

suficiente de la PIP y el desarrollo consiguiente de daño pulmonar, pues solamente la administración de un V_T elevado no es suficiente para anticipar que se desarrollará el daño tisular deseado en todos los animales.

Caracterización de dos fenotipos de acuerdo con la respuesta a la ventilación mecánica con V_T elevado

Los dos fenotipos (susceptible y resistente) se caracterizan por una diferente PIP basal (antes de comenzar el insulto), lo que indica que los factores fisiológicos o anatómicos propios de cada fenotipo son constitutivos del animal y determinan una diferente respuesta al insulto (ventilación mecánica con V_T elevado).

El presente diseño no permite determinar cuál de dos posibilidades opera para explicar la diferente susceptibilidad a la ventilación mecánica. La primera es que el fenotipo susceptible se caracteriza por ciertas características fisiológicas o anatómicas que resultan en una peor mecánica del sistema torácico, una mayor PIP basal y, consiguientemente, un mayor daño pulmonar. Es decir que el mayor daño pulmonar es consecuencia de la mayor PIP basal. O bien que la peor mecánica pulmonar y el mayor daño inducido por la ventilación mecánica son dos fenómenos paralelos, pero no relacionados causalmente. En efecto, el grupo resistente presenta elevaciones de la PIP al final del experimento entorno a 40 cm H_2O , mientras que el grupo susceptible sólo alcanza PIP alrededor de 25 cm H_2O . La diferencia es suficiente como para especular que en el segundo caso (grupo resistente) la elevación de la PIP es insuficiente para producir daño.

Se han planteado estudios en nuestro laboratorio para descartar la presencia de artefactos potencialmente explicativos de diferente PIP basal en algunos animales (uso de relajación neuromuscular, comprobación de la ausencia de intubación endobronquial, etc.), analizar la histología para determinar si hay hallazgos diferenciales en el grupo que presenta una mayor PIP basal, y analizar si elevaciones de PIP al final del experimento (aplicando mayores V_T) en el grupo resistente (identificado antes del experimento mediante una elevación del V_T y comprobación de la elevación subsiguiente de la PIP) origina el mismo daño que en los animales susceptibles.

El análisis presentado en el capítulo 3 (que es resultante de una adicional agrupación de los animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado de acuerdo con el valor inicial PIP) indica que todos los cambios descritos en el capítulo 2 asociados a la ventilación mecánica con V_T elevado se aprecian tan sólo en los animales que presentan una PIP basal elevada.

Ese es el caso de la hipotensión, la hipoxemia, el deterioro progresivo de la distensibilidad pulmonar y la elevación de la resistencia de la vía aérea, y los cambios histológicos en el pulmón. También los cambios descritos en la apoptosis e inflamación pulmonar, en el suero y en el tejido intestinal se aprecian principalmente en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado y que presentan una PIP

basal ≥ 27 cm H₂O, mientras que el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado con PIP basal <27 cm H₂O fue resistente a todos los cambios mencionados.

Este hallazgo resulta fundamental para la comprensión de nuestros resultados y los de otros investigadores, así como para el diseño de modelos experimentales de daño pulmonar agudo inducido por la ventilación mecánica. En efecto, el modelo no debe simplemente consistir en la aplicación de un V_T elevado, sino que hay que comprobar que la PIP alcanzada es suficiente para el desarrollo de daño pulmonar. Este comentario no es pertinente para los modelos en los cuales el daño se genera mediante la aplicación de una PIP elevada (ventilación controlada por volumen), pero ha de ser considerado si el modelo consiste en la aplicación de un V_T (ventilación controlada por volumen). Por otro lado, es posible que el análisis de muestras procedentes de animales ventilados con V_T elevado origine datos dispersos, pues la población de animales sometidos a ventilación mecánica con V_T elevado está realmente compuesta por dos subpoblaciones, una de animales susceptibles y otra de animales resistentes.

Como es de esperar y de acuerdo al sentido fisiopatológico de la interpretación de nuestros resultados, el tratamiento con DDS se asoció con efectos significativos tan sólo en el grupo sometido a ventilación mecánica con V_T elevado y que presentaba daño, es decir, al grupo con PIP basal elevada.

Estructura y función pulmonares

Características mecánicas

En relación a los resultados discutidos en el presente apartado, dentro del grupo de ratas ventiladas con V_T Alto, hemos encontrado dos fenotipos que son los resistentes y los susceptibles. Este hallazgo no se ha identificado en otros estudios. En el capítulo 2 hemos analizado el V_T elevado, pero en realidad hemos analizado dos grupos diferentes dentro del grupo de V_T elevado.

Disecionando el grupo de V_T elevado; el grupo susceptible reproduce marcadamente los cambios característicos de VILI. La distensibilidad del sistema torácico (C_{DYN}) disminuyó a lo largo del tiempo de observación. El grupo susceptible mostró un aumento progresivo de la presión pico (PIP) y de la resistencia de la vía aérea (R_{VA}) de aproximadamente un 40% y un 56%, respectivamente, en relación al valor basal, y una disminución de la distensibilidad (C_{DYN}) de un 35,3% (Fig. 5 y 6. Tablas 6 y 7). Mientras que el grupo resistente apenas mostró variaciones.

Los cambios de los parámetros de la mecánica respiratoria nos puede estar indicando que el grupo susceptible muestra alteraciones marcadas en la organización del pulmón. Sobre todo la disminución de la distensibilidad nos puede indicar que estaba desarrollando edema o fibrosis. Pero la fibrosis no puede ser posible por la brevedad del experimento.

Varios investigadores se cuestionaron si el edema pulmonar durante la VM ocurre al sobrepasar un determinado volumen y fue Carlton quien respondió con un modelo de

VILI en cordero. Al aumentar progresivamente el V_T también aumentaba las presiones teleinspiratorias a 16, 33, 43 y 61 cmH₂O; también demuestra que hay un aumento de la concentración de proteínas. Y se alcanza un nivel de presión de 61 cmH₂O sólo con un V_T más alto (57mL/kg). Lo que indicaba que las alteraciones microvasculares en respuesta a la sobredistensión ocurren al sobrepasar un límite de volumen/presión más que de forma gradual. Estos hallazgos fueron confirmados por escintigrafía que permitió evaluar los cambios simultáneos en la permeabilidad alveolar y microvascular durante la distensión en ratas con pulmones previamente sanos. Curiosamente se observaron los cambios de permeabilidad epitelial y endotelial con el mismo límite de presión teleinspiratoria (entre 20 a 25 cmH₂O corresponden a V_T de 13.7 ± 4.69 y 22.2 ± 2.12 mL/kg).

En conclusión, las ratas susceptibles desarrollan mayor inflamación y edema pulmonar que las ratas resistentes. Esta conclusión está apoyada también por la observación visual muy clara y evidente de edema pulmonar apreciado por el experimentador en el momento de la extracción de los tejidos al final del experimento. De la misma manera, los cambios de concentración de proteínas y de IgM en el lavado broncoalveolar respaldan que las ratas susceptibles desarrollan mayor inflamación y edema pulmonar que las ratas resistentes que conlleva a un descenso de la compliance pulmonar, atelectasias e hipoxemia que se asocia con el metabolismo anaerobio.

Intercambio gaseoso

Así mismo otro contribuyente para la disfunción pulmonar es la hipoxemia. El grupo susceptible mostró una disminución significativa de la PO₂ en el intervalo de 2,5 horas de VM; mientras que en el grupo resistente mostró un patrón contrario, es decir una tendencia de mejorar la oxigenación después de 2,5 hrs de VM, con respecto al tiempo basal (Figura 6 y 7. Tabla 8, 9 y 10). Esto se traduce que el grupo resistente no mostró disfunción pulmonar, aunque para llegar a esta deducción es necesario valorar también la permeabilidad alveolocapilar.

El tratamiento con la DDS no afecta al cambio inducido por la VM tanto en el subgrupo susceptible como en el resistente con respecto a los subgrupos no tratados respectivamente; esto da entender que la DDS no tiene ningún efecto biológico en macro sobre la disfunción pulmonar. Además el grupo susceptible tratado con DDS mostró una tendencia a la hipoxemia con respecto al no tratado. Esto nos podría indicar que la DDS podría tener algún efecto negativo en la funcionalidad pulmonar del subgrupo susceptible.

Permeabilidad alveolocapilar

Para complementar el estudio de la funcionalidad pulmonar se valoró la permeabilidad alveolocapilar midiendo la concentración de proteínas totales, IgM en el LBA y el ratio LBA/suero.

El aumento detectado en los animales susceptibles (en comparación con los animales resistentes) de la ratio, proteínas totales y Ig M en el LBA son marcados, este fenómeno denota edema pulmonar no hidrostático (característica esencial de VILI y de DPA) debido a alteraciones de la membrana alveolocapilar, y a su vez el aumento de citoquinas que contribuye a un aumento de proteínas. De hecho, la activación del estado proinflamatorio en el espacio alveolar se considera el principal contribuyente a las alteraciones de la membrana alveolocapilar y al daño tisular (como lo veremos posteriormente), lo cual está normalmente relacionado, como lo hemos detectado en el grupo susceptible. Además estos datos apoyan la hipótesis de que el mismo estrés induce diferentes vías de activación que conlleva a un desenlace atenuado o exacerbado dependiendo de la susceptibilidad a la VM lesiva o no protectora .

Muchos estudios refieren que la ventilación mecánica con PIP elevada conlleva a edema así como algunos estudios demuestran que una VM no protectora conlleva a un aumento de valores de PIP a lo largo del tiempo. Hemos observado un aumento significativo de PIP en el grupo sensible en contraste con el grupo resistente justo al comienzo de la ventilación mecánica no protectora, lo que agrava al cabo de una hora. Este resultado nos lleva a pensar que la PIP bajo estrategias fijas de V_T puede ser un marcador temprano, precoz de la susceptibilidad a la VM.

Cambios histológicos

En el capítulo 2 se caracterizó los cambios fisiopatológicos de VILI. Entre ellos se producen cambios histológicos pero no necesariamente todos desarrollan membranas hialinas y su presencia denota gravedad.

El 77,8% de las ratas susceptibles desarrollaron membranas hialinas, mientras que en el grupo resistente sólo el 36, 4% desarrollaron membranas hialinas.

Cambios sistémicos

Hipotensión

El grupo susceptible muestra mayores cambios de la presión arterial en relación al grupo resistente. Esto se debe a la marcada respuesta inflamatoria por parte del grupo susceptible desencadenada por la VM. Además, como se explicó en la discusión del capítulo 2, esta hipotensión es causada por la agresión de los radicales libres de oxígeno al endotelio vascular asociada a la ventilación mecánica.

Determinaciones bioquímicas séricas (glucosa, LDH, CK, GOT, GTP)

Debido a la descompartimentalización de los mediadores inflamatorios del pulmón hacia la vía sistémica; los órganos a distancia muestran disfunción y lesión.

El grupo susceptible mostró elevación de la actividad sérica de glucosa, GOT y GTP y (de forma no significativa) de creatinina, LDH y CK. Mientras que el grupo resistente no mostró alteraciones de la glucosa y creatinina y un aumento (de forma no significativa) de LDH, CK, GOT GTP.

El aumento de glucosa mostrado en el grupo susceptible es muestra de un fallo en el metabolismo energético (sercova y Getafe).

Y el aumento de GOT y GTP en el grupo susceptible es indicativo de daño celular inespecífico. Además no se encontraron cambios en la concentración de creatinina, las razones ya se explicaron en el capítulo 2.

Otras determinaciones en sangre (pH, lactato, PaCO₂)

Tantos las ratas susceptibles como las resistentes no mostraron daño sistémico, al no mostrar acidosis metabólica que se traduce con la no variación del bicarbonato arterial y ausencia de hiperlactatemia y tampoco se encontró cambios en el pH (que mostró una tendencia no significativa a una moderada disminución).

En resumen, encontramos que la ventilación mecánica en el grupo susceptibles se asocia, no sólo con cambios en la estructura y función pulmonares, sino también con cambios no pulmonares, que incluyen hipotensión y disfunción vascular in vitro, hiperglucemia y elevación de las enzimas GOT y GTP que indica daño inespecífico celular.

Respuesta inflamatoria pulmonar y apoptosis

En nuestro estudio las ratas susceptibles (en ratas no tratadas con DDS), en comparación con las ratas resistentes, se asoció con una marcada respuesta inflamatoria a nivel pulmonar. Esta respuesta inflamatoria se caracterizó por una significativa mayor concentración de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 y (no alcanzando la significación estadística) de IL-1 β . Se objetivó también que el grupo susceptible se asoció con una mayor expresión de genes (IL-6 y MCP-1) en comparación con el grupo resistente.

El sub-grupo grupo susceptible muestra un patrón en la expresión de genes y proteínas parecido al grupo ventilado con V_T alto. El desarrollo de la respuesta inflamatoria y el papel de las citoquinas estudiadas ya se explicó en el capítulo 2.

TLR-4

Tantos los animales susceptibles como los resistentes mostraron una disminución de la expresión de TLR4 en tejido pulmonar en relación con los animales ventilados con V_T Bajo.

Apoptosis

Nuestros resultados sugieren que el grupo susceptible sufre mayor apoptosis que el grupo resistente. El número de células fluorescentes por la técnica TUNEL es unas 7 veces mayor en el fenotipo susceptible en comparación con el grupo resistente (Figura 15).

En el grupo susceptible, las células apoptóticas (en su mayoría) parecen localizarse en la mucosa de la vía aérea mientras que en grupo resistente parecen localizarse en la pared alveolar. El aumento de la apoptosis asociado a VILI o al estiramiento *in vitro* ya ha sido documentado previamente. Sin embargo la demostración del diferente comportamiento apoptótico en los dos fenotipos: sensible y resistente bajo la misma estrategia ventilatoria, es objeto de estudio en el caso de implementar una terapéutica individualizada.

En resumen, la ventilación mecánica con V_T elevado presenta dos fenotipos: sensible y resistente. La sensible se asoció con una respuesta inflamatoria pulmonar caracterizada por elevación significativa de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 y sin llegar a la significación estadística de IL- β , de la expresión génica IL-6 y MCP-1.

Una de las características esenciales de un modelo experimental de VILI es la demostración de una respuesta inflamatoria pulmonar. En nuestro modelo el grupo susceptible reproduce esta condición más que el grupo resistente (deterioro de la respuesta mecánicas del pulmón, hiperpermeabilidad alveolocapilar, cambios histológicos consistentes con DAD), La demostración de una marcada y consistente respuesta inflamatoria hace que el grupo susceptible sea adecuado para el estudio del VILI, y del estudio de la fisiopatología y de intervenciones potencialmente terapéuticas en esta condición.

Respuesta inflamatoria: determinaciones séricas

Nosotros encontramos en el grupo susceptible en comparación con el grupo resistente un aumento de la concentración sérica aunque no de forma significativa de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 e IL-1 β (sin alcanzar la significación estadística) que indican descompartmentalización de la respuesta inflamatoria inducida en el pulmón por la ventilación mecánica con V_T elevado. la evidencia de estos cambios es importante, pues puede ser explicativa de daño en órganos no pulmonares en el contexto de VILI, incidiendo más en el grupo susceptible.

Respuesta inflamatoria intestinal

En el presente estudio hemos demostrado que las ratas susceptibles, en comparación con las ratas resistentes, se asocia con un aumento de la concentración intestinal de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1 (aunque no de forma significativa) y la expresión génica de MIP-2 y su receptor (CXCR-2) aumentaron de forma significativa. Mientras que el

grupo resistente se asocia con una disminución de la concentración de MIP-2 y una disminución de la expresión génica de MIP-2 y CXCR-2 en comparación con el grupo ventilado con Volúmen tidal bajo.

Cuál es la causa de que en el grupo susceptible haya un aumento de la concentración de MIP-2 y de la expresión génica de MIP-2 y de su receptor, CXCR-2, en el intestino (i) El aumento de MIP-2 en tejido pulmonar y en suero estimula la producción de MIP-2 y de su receptor a nivel intestinal. Varios estudios han analizado que la liberación de mediadores inflamatorios desencadenados en un tejido podría participar en la respuesta inflamatoria sistémica conllevando una disfunción multiorgánica. En efecto muchos investigadores han demostrado cambios en la pO_2 y la permeabilidad intestinal en respuesta a varios tipos de daño, incluyendo procesos de daño inflamatorio agudo. Guery demuestra que la activación de la cascada inflamatoria desencadenada por VILI (30ml/kg durante 120 minutos) repercute negativamente al pulmón y a los órganos a distancia (intestino) aumentando la permeabilidad en ambos órganos y este proceso puede prevenirse bloqueando el TNF- α (a nivel sistémico) con un anticuerpo policlonal anti-TNF- α .

Las explicaciones del efecto del pulmón sometido a VM con V_t elevado (en el grupo resistente) sobre las disminuciones de la concentración tisular (intestino) de MIP-2, y la disminución de la expresión génica de MIP-2 y CXCR-2 es desconocido. La explicación podría ser (1) que el pulmón del grupo resistente libera menos cantidad de mediadores inflamatorios que el grupo susceptible, y la permeabilidad alveolocapilar no está tan deteriorada como en el grupo susceptible, debido a ello hay menos descompartimentalización del pulmón a la vía sistémica y a los órganos a distancia. (2) El pulmón de las ratas susceptibles liberan un mediador antiinflamatorio que ejerce un efecto inhibitorio sobre el sistema inmune innato intestinal.

Efecto del tratamiento de la DDS sobre los cambios inducidos por la PIP en el grupo ventilado con V_T alto

Estructura y función pulmonar

En las ratas susceptibles, el tratamiento con DDS se asoció con una menor elevación de la resistencia de la vía aérea (R_{VA}) (Figura 5, tabla 7). Paralelamente, también se asoció con una tendencia (no significativa) a una menor elevación de la PIP.

Los efectos beneficiosos del tratamiento con DDS sobre la resistencia se explica por una menor formación de edema (figura 11 y 12). En la situación de un efecto antiinflamatorio del tratamiento con DDS.

Intercambio gaseoso

La hipoxemia inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado afectó más al subgrupo susceptible y menos al resistente. Paralelamente esta disminución de PO_2 no se modificó con tratamiento con DDS, en ambos subgrupos (Fig. 8, 9 y 11 y tabla 11).

Permeabilidad alveolocapilar

La VM con V_T elevado induce edema debido a las alteraciones en la membrana alveolocapilar que afecta sobretodo al grupo resistente y menos al grupo sensible. El tratamiento con DDS en ambos subgrupos: susceptibles y resistentes se asocian con una disminución de la permeabilidad alveolocapilar, apoyado por la disminución del ratio de proteínas (LBA/suero) (Fig. 9) y apoyado también por la determinación de una menor concentración de Ig M en el espacio alveolar (Fig.10). Se puede deducir, que la DDS tiene algún efecto protector, atenuando el edema, inducido por la VM con V_T elevado.

Cambios histológicos

El tratamiento con DDS tanto en el grupo susceptible como en el resistente no influyó en el índice de daño pulmonar, que es una medida de gravedad de DAD. Esto nos indica que la atenuación de la respuesta inflamatoria reflejada en las ratas sometidas a VM y previamente tratadas con DDS, no tiene ese grado de intensidad para mermar la presencia de membranas hialinas.

Cambios sistémicos

Como se ha señalado anteriormente, la ventilación mecánica con volúmen tidal elevado se asoció con hipotensión durante el periodo de ventilación mecánica (tanto en el grupo susceptible como en el resistente). El tratamiento con DDS no modificó este cambio sobre la presión arterial media.

Se ha valorado la respuesta inflamatoria mediante la expresión proteica y génica de citoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo la respuesta antiinflamatoria desencadenada con el tratamiento con la DDS no es suficiente para corregir la hipotensión inducida por la estrategia ventilatoria lesiva tanto en el grupo susceptible como en el resistente.

Determinaciones bioquímicas séricas (glucosa, LDH, CK, GOT, GTP)

La ventilación mecánica con V_T elevado se asoció con cambios en la concentración sérica de la glucosa y en la actividad sérica de la LDH, CK, GOT y GTP. (Tanto en el grupo resistente como en el susceptibles). Sin embargo el efecto antiinflamatorio de la DDS no fue lo suficiente para corregir los parámetros bioquímicos mencionados.

Respuesta inflamatoria pulmonar y apoptosis

Los efectos de la ventilación mecánica con V_T elevado sobre el grupo susceptible, incluyeron un aumento significativo de la concentración tisular y de la expresión génica de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1. Sin embargo sobre el grupo resistente hubo sólo tendencia a un aumento de la concentración tisular y de la expresión génica de TNF- α , IL-6, MIP-2, MCP-1 e IL-1 β . Sabiendo esto ¿Cuál es el efecto del tratamiento con DDS

sobre la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por la ventilación mecánica con V_T elevado sobre el subgrupo susceptible y resistente?

En este capítulo se han analizado los efectos del tratamiento con DDS en el status del sistema inmune innato del pulmón en condiciones de VILI, tanto en el grupo susceptible como en el resistente (¿modulan las bacterias intestinales la respuesta inmune pulmonar a la ventilación mecánica?).

En los animales susceptibles, el tratamiento con DDS atenúo el aumento de la concentración tisular de TNF- α , IL-6, MIP-2 y MCP-1. Mientras que en el grupo resistente fue similar en los animales tratados con DDS que en los animales no tratados.

En los animales susceptibles, el tratamiento con DDS atenuó la expresión génica de IL-6, MCP-1, CXCR2 y CCR2 mientras en los animales resistentes sólo atenuó la expresión génica de MIP-2.

La respuesta inflamatoria desencadenada por VILI fue mayor en el grupo susceptible. Nuestros resultados muestran un efecto antiinflamatorio del tratamiento de la DDS más marcado en el grupo susceptible que en el resistente. Existen resultados similares con otros modelos de lesión que inducen una inflamación muy marcada (citas); demostrando que el tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria. Esto quiere decir que la flora intestinal influye a la respuesta inflamatoria sistémica y al daño (inflamación) en otros órganos

Lo novedoso de nuestros resultados, es que pone en evidencia que el grado del efecto antiinflamatorio de la DDS depende de la susceptibilidad a un daño inducido por la VM.

En el grupo susceptible el tratamiento con DDS se asocia con una disminución de la resistencia, probablemente debido al efecto antiinflamatorio desencadenada por la DDS respaldado por una menor concentración y una menor expresión genica de citoquinas pro-inflamatoria a nivel tisular.

Apoptosis

El grupo susceptible mostró mayor grado de apoptosis que el grupo resistente. Sin embargo el tratamiento con DDS atenúo la apoptosis en el grupo resistente.

Respuesta inflamatoria determinaciones séricas

El tratamiento con DDS se asocia con un efecto supresor de la respuesta inmune (menor concentración sérica de TNF- α , IL-6) tanto en los animales susceptibles como en los resistentes.

Respuesta inflamatoria intestinal

La IL-6 es una citoquina inducible, de forma temprana sintetizada por muchos tipos de células, participando en la iniciación y regulación de la inflamación (Jones 2005). La IL-6 no parece ser más que una citoquina inducida en la fase aguda, y debería ser definida como un factor producto del equilibrio/balance entre la pro y antiinflamación resultado de la respuesta inmunológica. Nuestros resultados indican un posible papel modulador de IL-6 sobre las citoquinas proinflamatorias como hemos observado en un patrón contradictorio en los grupos tratados y no tratados con DDS. Mientras que el tejido intestinal del grupo tratado con DDS, los niveles de IL-6 están aumentados en relación al grupo no tratado. TNF- α , MCP-1 y MIP-2 están ligeramente disminuidos.

Estos datos sugieren que la IL-6 tiene un papel regulador en el grupo tratado con DDS y no se altera casi en el grupo no tratado con DDS.

Volker pone en evidencia que la estimulación de las células mononucleares del intestino por la polimixina, o la activación del sistema inmune innato por productos bacterianos procedentes de bacterias muertas como consecuencia del tratamiento con DDS. Estos mecanismos podrían explicar algunos de los aspectos de los cambios observados, como son la elevación de la concentración de la IL-6 en el tejido intestinal en animales tratados con DDS.

En resumen, hemos demostrado que la VM lesiva o no protectora podría desarrollar 2 tipos diferentes de desenlaces según la susceptibilidad del animal. Uno de los factores que parece contribuir a proteger el pulmón frente a la VM es la respuesta inflamatoria atenuada donde la DDS juega un papel importante. En el grupo sensible el tratamiento con la DDS atenúa el aumento de las citoquinas pro-inflamatorias, sin embargo este efecto no es suficiente para poder prevenir el deterioro del intercambio gaseoso, de la mecánica ventilatoria, el aumento de edema y el daño tisular.

Para concluir, estos resultados indican que la respuesta inflamatoria a nivel pulmonar en la ventilación lesiva o no protectora está atenuada por la DDS.

Resumen de la discusión del capítulo 3

Hemos demostrado que la VM lesiva o no protectora podría desarrollar dos tipos diferentes de desenlaces según la susceptibilidad del animal. En el grupo susceptible hay un deterioro marcado de las propiedades mecánicas del pulmón, disfunción pulmonar (deterioro del intercambio gaseoso, hiperpermeabilidad) así como el desarrollo de membranas hialinas característico de SDRA. Sin embargo, el grupo no sufrió cambios significativos.

Hemos encontrado que el tratamiento con DDS atenúa el deterioro de la resistencia y la permeabilidad alveolocapilar y la respuesta inflamatoria a la ventilación mecánica en el grupo susceptible.

Estas alteraciones son consistentes con un efecto antiinflamatorio del tratamiento con DDS. Paralelamente se puede concluir que las bacterias intestinales tienen un papel amplificador de la respuesta inflamatoria tras un insulto, en nuestro caso, la ventilación mecánica con V_T elevado.

VII. Conclusiones

Conclusiones

1. Demostramos que es posible descontaminar el tracto digestivo en ratas con un protocolo de tratamiento administrado durante 24 h.
2. La administración de ventilación mecánica con V_T elevado en nuestro modelo se asocia con una respuesta inflamatoria pulmonar, disfunción pulmonar, signos de daño alveolar difuso, y cambios sistémicos.
3. El tratamiento con DDS atenúa la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica asociada a la ventilación mecánica utilizando V_T elevado.
4. Demostramos un efecto dual de la ventilación mecánica previamente no reconocido.
5. Los efectos nocivos de la ventilación mecánica con V_T elevado se aprecian sólo en los animales que presentan un valor elevado de PIP al inicio del experimento. Sólo en este grupo con PIP elevada se demuestran los efectos beneficiosos del tratamiento con DDS.
6. Nuestros resultados demuestran que la flora intestinal modula la respuesta pulmonar a un estímulo inflamatorio.

VIII. Referencias Bibliográficas

1. Webb, H.H. and D.F. Tierney, *Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure*. Am Rev Respir Dis, 1974. 110(5): p. 556-65.
2. Dreyfuss, D., et al., *Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats*. Am Rev Respir Dis, 1985. 132(4): p. 880-4.
3. Dreyfuss, D., et al., *High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure*. Am Rev Respir Dis, 1988. 137(5): p. 1159-64.
4. Tremblay, L., et al., *Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model*. J Clin Invest, 1997. 99(5): p. 944-52.
5. Imai, Y., et al., *Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation*. J Appl Physiol (1985), 2001. 91(4): p. 1836-44.
6. Tremblay, L.N., et al., *Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNA*. Crit Care Med, 2002. 30(8): p. 1693-700.
7. Veldhuizen, R.A., et al., *Effects of mechanical ventilation of isolated mouse lungs on surfactant and inflammatory cytokines*. Eur Respir J, 2001. 17(3): p. 488-94.
8. von Bethmann, A.N., et al., *Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 157(1): p. 263-72.
9. Murphy, D.B., et al., *Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(1): p. 27-33.
10. Nahum, A., et al., *Effect of mechanical ventilation strategy on dissemination of intratracheally instilled Escherichia coli in dogs*. Crit Care Med, 1997. 25(10): p. 1733-43.
11. de Prost, N., et al., *Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications*. Ann Intensive Care, 2011. 1(1): p. 28.
12. Esteban, A., et al., *Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study*. JAMA, 2002. 287(3): p. 345-55.
13. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults*. Lancet, 1967. 2(7511): p. 319-23.
14. Phua, J., T.E. Stewart, and N.D. Ferguson, *Acute respiratory distress syndrome 40 years later: time to revisit its definition*. Crit Care Med, 2008. 36(10): p. 2912-21.
15. Cabello, B. and A.W. Thille, *[Are we able to optimize the definition and diagnosis of severe acute respiratory distress syndrome?]*. Med Intensiva, 2012. 36(5): p. 322-3.
16. Ferguson, N.D., et al., *High values of the pulmonary artery wedge pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome*. Intensive Care Med, 2002. 28(8): p. 1073-7.

17. Wheeler, A.P., et al., *Pulmonary-artery versus central venous catheter to guide treatment of acute lung injury*. N Engl J Med, 2006. 354(21): p. 2213-24.
18. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA, 2012. 307(23): p. 2526-33.
19. Frutos-Vivar, F., N. Nin, and A. Esteban, *Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome*. Curr Opin Crit Care, 2004. 10(1): p. 1-6.
20. Gattinoni, L., et al., *Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes?* Am J Respir Crit Care Med, 1998. 158(1): p. 3-11.
21. Goodman, L.R., et al., *Adult respiratory distress syndrome due to pulmonary and extrapulmonary causes: CT, clinical, and functional correlations*. Radiology, 1999. 213(2): p. 545-52.
22. Lim, C.M., et al., *Comparison of the response to the prone position between pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome*. Intensive Care Med, 2001. 27(3): p. 477-85.
23. Brun-Buisson, C., et al., *Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study*. Intensive Care Med, 2004. 30(1): p. 51-61.
24. Esteban, A., et al., *Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. 177(2): p. 170-7.
25. Bersten, A.D., et al., *Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 165(4): p. 443-8.
26. Arroliga, A.C., et al., *Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio*. Chest, 2002. 121(6): p. 1972-6.
27. Estenssoro, E., et al., *Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Med, 2002. 30(11): p. 2450-6.
28. Villar, J. and A.S. Slutsky, *The incidence of the adult respiratory distress syndrome*. Am Rev Respir Dis, 1989. 140(3): p. 814-6.
29. Stapleton, R.D., et al., *Causes and timing of death in patients with ARDS*. Chest, 2005. 128(2): p. 525-32.
30. Rubenfeld, G.D., et al., *Incidence and outcomes of acute lung injury*. N Engl J Med, 2005. 353(16): p. 1685-93.
31. Rubenfeld, G.D. and M.S. Herridge, *Epidemiology and outcomes of acute lung injury*. Chest, 2007. 131(2): p. 554-62.
32. Ferring, M. and J.L. Vincent, *Is outcome from ARDS related to the severity of respiratory failure?* Eur Respir J, 1997. 10(6): p. 1297-300.
33. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. 342(18): p. 1334-49.
34. Matthay, M.A., L.B. Ware, and G.A. Zimmerman, *The acute respiratory distress syndrome*. J Clin Invest, 2012. 122(8): p. 2731-40.
35. Phua, J., et al., *Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. 179(3): p. 220-7.

36. Dirkes, S., et al., *Prone positioning: is it safe and effective?* Crit Care Nurs Q, 2012. 35(1): p. 64-75.
37. Frohlich, S., et al., *Acute respiratory distress syndrome: current concepts and future directions.* Anaesth Intensive Care, 2013. 41(4): p. 463-72.
38. Cortes, I., O. Penuelas, and A. Esteban, *Acute respiratory distress syndrome: evaluation and management.* Minerva Anestesiol, 2012. 78(3): p. 343-57.
39. Martinez, O., N. Nin, and A. Esteban, [*Prone position for the treatment of acute respiratory distress syndrome: a review of current literature*]. Arch Bronconeumol, 2009. 45(6): p. 291-6.
40. Khadim, M.F., et al., *Mortality estimates in the elderly burn patients: the Northern Ireland experience.* Burns, 2009. 35(1): p. 107-13.
41. Martin, T.R., M. Nakamura, and G. Matute-Bello, *The role of apoptosis in acute lung injury.* Crit Care Med, 2003. 31(4 Suppl): p. S184-8.
42. Lipke, A.B., et al., *Death receptors mediate the adverse effects of febrile-range hyperthermia on the outcome of lipopolysaccharide-induced lung injury.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. 301(1): p. L60-70.
43. Zhu, H., et al., *Impaired adenosine-5'-triphosphate release from red blood cells promotes their adhesion to endothelial cells: a mechanism of hypoxemia after transfusion.* Crit Care Med, 2011. 39(11): p. 2478-86.
44. Bachofen, M. and E.R. Weibel, *Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome.* Clin Chest Med, 1982. 3(1): p. 35-56.
45. Matthay, M.A., L. Robriquet, and X. Fang, *Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury.* Proc Am Thorac Soc, 2005. 2(3): p. 206-13.
46. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex.* Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 286(6): p. C1213-28.
47. Carles, M., et al., *Critical role of the small GTPase RhoA in the development of pulmonary edema induced by Pseudomonas aeruginosa in mice.* Anesthesiology, 2010. 113(5): p. 1134-43.
48. Cavanaugh, K.J., Jr. and S.S. Margulies, *Measurement of stretch-induced loss of alveolar epithelial barrier integrity with a novel in vitro method.* Am J Physiol Cell Physiol, 2002. 283(6): p. C1801-8.
49. Martinez-Caro, L., et al., *Role of free radicals in vascular dysfunction induced by high tidal volume ventilation.* Intensive Care Med, 2009. 35(6): p. 1110-9.
50. Han, X., et al., *Increased iNOS activity is essential for hepatic epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. 286(1): p. G126-36.
51. Landry, D.W., et al., *Vasopressin pressor hypersensitivity in vasodilatory septic shock.* Crit Care Med, 1997. 25(8): p. 1279-82.
52. Worthen, G.S. and P.M. Henson, *Mechanisms of acute lung injury.* Clin Lab Med, 1983. 3(4): p. 601-17.
53. Thille, A.W., et al., *Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies.* Lancet Respir Med, 2013. 1(5): p. 395-401.
54. Katzenstein, A.L., C.M. Bloor, and A.A. Leibow, *Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review.* Am J Pathol, 1976. 85(1): p. 209-28.

55. Zapol, W.M., et al., *Extracorporeal membrane oxygenation in severe acute respiratory failure. A randomized prospective study.* JAMA, 1979. 242(20): p. 2193-6.
56. Mercat, A., et al., *Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.* JAMA, 2008. 299(6): p. 646-55.
57. Walmsley, S.R., et al., *Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is essential for hypoxic regulation of neutrophilic inflammation in humans and mice.* J Clin Invest, 2011. 121(3): p. 1053-63.
58. Stevens, T., et al., *AZD9668: pharmacological characterization of a novel oral inhibitor of neutrophil elastase.* J Pharmacol Exp Ther, 2011. 339(1): p. 313-20.
59. Fujino, N., et al., *Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after acute lung injury in mice.* Exp Lung Res, 2012. 38(1): p. 28-36.
60. Takemasa, A., Y. Ishii, and T. Fukuda, *A neutrophil elastase inhibitor prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.* Eur Respir J, 2012. 40(6): p. 1475-82.
61. Jacobson, J.R., *Pharmacologic therapies on the horizon for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome.* J Investig Med, 2009. 57(8): p. 870-3.
62. Uhlig, S. and E. Gulbins, *Sphingolipids in the lungs.* Am J Respir Crit Care Med, 2008. 178(11): p. 1100-14.
63. Abbasi, T. and J.G. Garcia, *Sphingolipids in lung endothelial biology and regulation of vascular integrity.* Handb Exp Pharmacol, 2013(216): p. 201-26.
64. Serhan, C.N. and N. Chiang, *Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus.* Br J Pharmacol, 2008. 153 Suppl 1: p. S200-15.
65. Hsiao, H.M., et al., *A novel anti-inflammatory and pro-resolving role for resolvin D1 in acute cigarette smoke-induced lung inflammation.* PLoS One, 2013. 8(3): p. e58258.
66. Liao, Z., et al., *Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPARgamma/NF-kappaB pathway.* Respir Res, 2012. 13: p. 110.
67. Chen, W., et al., *Critical role for integrin-beta4 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. 303(4): p. L279-85.
68. van der Heijden, M., et al., *Angiopoietin-2, permeability oedema, occurrence and severity of ALI/ARDS in septic and non-septic critically ill patients.* Thorax, 2008. 63(10): p. 903-9.
69. van der Heijden, M., et al., *The interaction of soluble Tie2 with angiopoietins and pulmonary vascular permeability in septic and nonseptic critically ill patients.* Shock, 2010. 33(3): p. 263-8.
70. Glas, G.J., et al., *Bronchoalveolar hemostasis in lung injury and acute respiratory distress syndrome.* J Thromb Haemost, 2013. 11(1): p. 17-25.
71. Bo, L., et al., *Activated protein C inhalation: a novel therapeutic strategy for acute lung injury.* Med Sci Monit, 2011. 17(6): p. HY11-3.

72. Imai, Y., et al., *Production of IgA monoclonal antibody against Shiga toxin binding subunits employing nasal-associated lymphoid tissue*. J Immunol Methods, 2005. 302(1-2): p. 125-35.
73. Wang, R., et al., *Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 279(1): p. L143-51.
74. Bechara, R.I., et al., *Angiotensin II mediates glutathione depletion, transforming growth factor-beta1 expression, and epithelial barrier dysfunction in the alcoholic rat lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. 289(3): p. L363-70.
75. Imai, Y., et al., *Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury*. Cell, 2008. 133(2): p. 235-49.
76. Sheppard, D., *Modulation of acute lung injury by integrins*. Proc Am Thorac Soc, 2012. 9(3): p. 126-9.
77. Woodside, D.G. and P. Vanderslice, *Cell adhesion antagonists: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. BioDrugs, 2008. 22(2): p. 85-100.
78. Cai, Z.G., et al., *MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. 90(1): p. 37-43.
79. Adyshev, D.M., et al., *MicroRNA regulation of nonmuscle myosin light chain kinase expression in human lung endothelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. 49(1): p. 58-66.
80. Kim, T.H., et al., *The role of endogenous histamine on the pathogenesis of the lipopolysaccharide (LPS)-induced, acute lung injury: a pilot study*. Inflammation, 2005. 29(2-3): p. 72-80.
81. Ryffel, B., et al., *Histamine scavenging attenuates endotoxin-induced acute lung injury*. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1056: p. 197-205.
82. Sadikot, R.T. and I. Rubinstein, *Long-acting, multi-targeted nanomedicine: addressing unmet medical need in acute lung injury*. J Biomed Nanotechnol, 2009. 5(6): p. 614-9.
83. Kaviratna, A.S. and R. Banerjee, *Nanovesicle aerosols as surfactant therapy in lung injury*. Nanomedicine, 2012. 8(5): p. 665-72.
84. Bates, J.H. and C.G. Irvin, *Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle*. J Appl Physiol (1985), 2003. 94(4): p. 1297-306.
85. Matute-Bello, G., C.W. Frevert, and T.R. Martin, *Animal models of acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 295(3): p. L379-99.
86. Parker, J.C., et al., *Increased microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressures*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1984. 57(6): p. 1809-16.
87. Argiras, E.P., et al., *High PEEP decreases hyaline membrane formation in surfactant deficient lungs*. Br J Anaesth, 1987. 59(10): p. 1278-85.
88. Bilek, A.M., K.C. Dee, and D.P. Gaver, 3rd, *Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening*. J Appl Physiol (1985), 2003. 94(2): p. 770-83.
89. Muscedere, J.G., et al., *Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. 149(5): p. 1327-34.

90. Hickling, K.G., S.J. Henderson, and R. Jackson, *Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome*. Intensive Care Med, 1990. 16(6): p. 372-7.
91. Jardin, F., et al., *Improved prognosis of acute respiratory distress syndrome 15 years on*. Intensive Care Med, 1999. 25(9): p. 936-41.
92. Pingleton, S.K., *Complications of acute respiratory failure*. Am Rev Respir Dis, 1988. 137(6): p. 1463-93.
93. Hernandez, L.A., et al., *Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits*. J Appl Physiol (1985), 1989. 66(5): p. 2364-8.
94. Carlton, D.P., et al., *Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs*. J Appl Physiol (1985), 1990. 69(2): p. 577-83.
95. de Prost, N., D. Dreyfuss, and G. Saumon, *Evaluation of two-way protein fluxes across the alveolo-capillary membrane by scintigraphy in rats: effect of lung inflation*. J Appl Physiol (1985), 2007. 102(2): p. 794-802.
96. Dreyfuss, D. and G. Saumon, *Role of tidal volume, FRC, and end-inspiratory volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation*. Am Rev Respir Dis, 1993. 148(5): p. 1194-203.
97. Corbridge, T.C., et al., *Adverse effects of large tidal volume and low PEEP in canine acid aspiration*. Am Rev Respir Dis, 1990. 142(2): p. 311-5.
98. de Prost, N., et al., *Alveolar edema dispersion and alveolar protein permeability during high volume ventilation: effect of positive end-expiratory pressure*. Intensive Care Med, 2007. 33(4): p. 711-7.
99. Tsuno, K., et al., *Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures*. Am Rev Respir Dis, 1991. 143(5 Pt 1): p. 1115-20.
100. Markos, J., et al., *Effect of positive end-expiratory pressure on leukocyte transit in rabbit lungs*. J Appl Physiol (1985), 1993. 74(6): p. 2627-33.
101. Kawano, T., et al., *Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung*. J Appl Physiol (1985), 1987. 62(1): p. 27-33.
102. Kolobow, T., et al., *Severe impairment in lung function induced by high peak airway pressure during mechanical ventilation. An experimental study*. Am Rev Respir Dis, 1987. 135(2): p. 312-5.
103. Dreyfuss, D., J.D. Ricard, and G. Saumon, *On the physiologic and clinical relevance of lung-borne cytokines during ventilator-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 167(11): p. 1467-71.
104. Ricard, J.D., D. Dreyfuss, and G. Saumon, *Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(5): p. 1176-80.
105. Bouadma, L., et al., *Mechanical ventilation and hemorrhagic shock-resuscitation interact to increase inflammatory cytokine release in rats*. Crit Care Med, 2007. 35(11): p. 2601-6.
106. Bouadma, L., et al., *Ventilation strategy affects cytokine release after mesenteric ischemia-reperfusion in rats*. Crit Care Med, 2004. 32(7): p. 1563-9.

107. Ranieri, V.M., et al., *Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome*. JAMA, 2000. 284(1): p. 43-4.
108. Parsons, P.E., et al., *Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury*. Crit Care Med, 2005. 33(1): p. 1-6; discussion 230-2.
109. Stuber, F., et al., *Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury*. Intensive Care Med, 2002. 28(7): p. 834-41.
110. Pugin, J., *Is the ventilator responsible for lung and systemic inflammation?* Intensive Care Med, 2002. 28(7): p. 817-9.
111. Schortgen, F., et al., *Infectious and inflammatory dissemination are affected by ventilation strategy in rats with unilateral pneumonia*. Intensive Care Med, 2004. 30(4): p. 693-701.
112. Dreyfuss, D., P. Soler, and G. Saumon, *Spontaneous resolution of pulmonary edema caused by short periods of cyclic overinflation*. J Appl Physiol (1985), 1992. 72(6): p. 2081-9.
113. John, E., et al., *Ultrastructure of the lung after ventilation*. Br J Exp Pathol, 1982. 63(4): p. 401-7.
114. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(1): p. 23-35.
115. Zingoni, A., et al., *NK cell regulation of T cell-mediated responses*. Mol Immunol, 2005. 42(4): p. 451-4.
116. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. 17(3): p. 138-46.
117. Mantovani, A., et al., *Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations*. Tumori, 2003. 89(5): p. 459-68.
118. Zhai, Y. and J.W. Kupiec-Weglinski, *What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance?* Curr Opin Immunol, 1999. 11(5): p. 497-503.
119. Ranieri, V.M., et al., *Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. JAMA, 1999. 282(1): p. 54-61.
120. Imai, Y., et al., *Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits*. J Appl Physiol (1985), 1999. 87(2): p. 510-5.
121. Johanson, W.G., Jr., et al., *Dissemination of Pseudomonas aeruginosa during lung infection in hamsters. Role of oxygen-induced lung injury*. Am Rev Respir Dis, 1985. 132(2): p. 358-61.
122. Slutsky, A.S. and L.N. Tremblay, *Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor?* Am J Respir Crit Care Med, 1998. 157(6 Pt 1): p. 1721-5.
123. Tschumperlin, D.J., J. Oswari, and A.S. Margulies, *Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(2 Pt 1): p. 357-62.
124. Millar, A.B., et al., *Tumour necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome*. Lancet, 1989. 2(8665): p. 712-4.

125. von Luettichau, I., et al., *RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues*. Cytokine, 1996. 8(1): p. 89-98.
126. Laffey, J.G., D. Engelberts, and B.P. Kavanagh, *Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 161(1): p. 141-6.
127. Laffey, J.G., et al., *Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following in vivo lung reperfusion*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(6): p. 2287-94.
128. Goodman, R.B., et al., *Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. 14(6): p. 523-35.
129. Copland, I.B., et al., *Early changes in lung gene expression due to high tidal volume*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 168(9): p. 1051-9.
130. Bhatia, M. and S. Moochhala, *Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome*. J Pathol, 2004. 202(2): p. 145-56.
131. Leser, H.G., et al., *Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis*. Gastroenterology, 1991. 101(3): p. 782-5.
132. Remick, D.G., et al., *Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days*. Shock, 2002. 17(6): p. 463-7.
133. Verbrugge, S.J., et al., *Exogenous surfactant preserves lung function and reduces alveolar Evans blue dye influx in a rat model of ventilation-induced lung injury*. Anesthesiology, 1998. 89(2): p. 467-74.
134. Anzueto, A., et al., *Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome*. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. N Engl J Med, 1996. 334(22): p. 1417-21.
135. Spragg, R.G., et al., *Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2004. 351(9): p. 884-92.
136. Willson, D.F., et al., *Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial*. JAMA, 2005. 293(4): p. 470-6.
137. Kacmarek, R.M., et al., *Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173(8): p. 882-9.
138. Ricard, J.D., et al., *Dose-response effect of perfluorocarbon administration on lung microvascular permeability in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 168(11): p. 1378-82.
139. Guerin, C., et al., *Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial*. JAMA, 2004. 292(19): p. 2379-87.
140. Taccone, P., et al., *Prone positioning in patients with moderate and severe acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. JAMA, 2009. 302(18): p. 1977-84.
141. Mancebo, J., et al., *A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173(11): p. 1233-9.

142. Sud, S., et al., *Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systematic review and meta-analysis*. Intensive Care Med, 2010. 36(4): p. 585-99.
143. Broccard, A.F., et al., *Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Med, 1997. 25(1): p. 16-27.
144. Richter, T., et al., *Effect of prone position on regional shunt, aeration, and perfusion in experimental acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. 172(4): p. 480-7.
145. Parker, J.C., C.L. Ivey, and J.A. Tucker, *Gadolinium prevents high airway pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs*. J Appl Physiol (1985), 1998. 84(4): p. 1113-8.
146. de Prost, N., et al., *Terbutaline lessens protein fluxes across the alveolo-capillary barrier during high-volume ventilation*. Intensive Care Med, 2008. 34(4): p. 763-70.
147. Parker, J.C., *Inhibitors of myosin light chain kinase and phosphodiesterase reduce ventilator-induced lung injury*. J Appl Physiol (1985), 2000. 89(6): p. 2241-8.
148. Muller, H.C., et al., *Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice*. Thorax, 2010. 65(12): p. 1077-84.
149. Wilson, M.R., S. Choudhury, and M. Takata, *Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. 288(4): p. L599-607.
150. Guery, B.P., et al., *Ventilation-induced lung injury is associated with an increase in gut permeability*. Shock, 2003. 19(6): p. 559-63.
151. Jerng, J.S., et al., *Role of the renin-angiotensin system in ventilator-induced lung injury: an in vivo study in a rat model*. Thorax, 2007. 62(6): p. 527-35.
152. Jiang, J.S., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril attenuates ventilator-induced lung injury in rats*. J Appl Physiol (1985), 2007. 102(6): p. 2098-103.
153. Siempos, II, et al., *Pretreatment with atorvastatin attenuates lung injury caused by high-stretch mechanical ventilation in an isolated rabbit lung model*. Crit Care Med, 2010. 38(5): p. 1321-8.
154. Muller, H.C., et al., *Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice*. Crit Care, 2010. 14(4): p. R143.
155. Bourlioux, P., et al., *The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002*. Am J Clin Nutr, 2003. 78(4): p. 675-83.
156. Fagarasan, S., et al., *Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora*. Science, 2002. 298(5597): p. 1424-7.
157. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. 406(6797): p. 782-7.
158. Elewaut, D., et al., *NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria*. J Immunol, 1999. 163(3): p. 1457-66.

159. Brandtzaeg, P.E., *Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy*. Ann N Y Acad Sci, 2002. 964: p. 13-45.
160. Cummings, J.H., et al., *PASSCLAIM--gut health and immunity*. Eur J Nutr, 2004. 43 Suppl 2: p. II118-II173.
161. Guarner, F., et al., *Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. 3(5): p. 275-84.
162. Jung, H.C., et al., *A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion*. J Clin Invest, 1995. 95(1): p. 55-65.
163. Gershewald, J.E., et al., *Interleukin 1 receptor blockade attenuates the host inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(13): p. 4966-70.
164. Sironi, M., et al., *IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells*. J Immunol, 1989. 142(2): p. 549-53.
165. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview*. Annu Rev Immunol, 1990. 8: p. 253-78.
166. Raffatellu, M., et al., *Lipocalin-2 resistance confers an advantage to Salmonella enterica serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine*. Cell Host Microbe, 2009. 5(5): p. 476-86.
167. Grivennikov, S., et al., *IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer*. Cancer Cell, 2009. 15(2): p. 103-13.
168. Rolfe, R.D., *Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host*. Rev Infect Dis, 1984. 6 Suppl 1: p. S73-9.
169. Simon, G.L. and S.L. Gorbach, *The human intestinal microflora*. Dig Dis Sci, 1986. 31(9 Suppl): p. 147S-162S.
170. Donaldson, R.M., Jr., *Significance of small bowel bacteria*. Am J Clin Nutr, 1968. 21(9): p. 1088-96.
171. Savage, D.C., *Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition*. Annu Rev Nutr, 1986. 6: p. 155-78.
172. Moore, W.E. and L.V. Holdeman, *Some newer concepts of the human intestinal flora*. Am J Med Technol, 1975. 41(11): p. 427-30.
173. Donaldson, R.M., Jr., *Role of enteric microorganisms in malabsorption*. Fed Proc, 1967. 26(5): p. 1426-31.
174. Abrams, G.D., *Microbial effects on mucosal structure and function*. Am J Clin Nutr, 1977. 30(11): p. 1880-6.
175. Hill, M.J., *Bile, bacteria and bowel cancer*. Gut, 1983. 24(10): p. 871-5.
176. Gorbach, S.L. and B.R. Goldin, *The intestinal microflora and the colon cancer connection*. Rev Infect Dis, 1990. 12 Suppl 2: p. S252-61.
177. Boxenbaum, H.G., et al., *Influence of gut microflora on bioavailability*. Drug Metab Rev, 1979. 9(2): p. 259-79.
178. Arnow, P.M., et al., *Randomized controlled trial of selective bowel decontamination for prevention of infections following liver transplantation*. Clin Infect Dis, 1996. 22(6): p. 997-1003.
179. Hellinger, W.C., et al., *A randomized, prospective, double-blinded evaluation of selective bowel decontamination in liver transplantation*. Transplantation, 2002. 73(12): p. 1904-9.

180. Ferrer, M., et al., *Utility of selective digestive decontamination in mechanically ventilated patients*. *Ann Intern Med*, 1994. 120(5): p. 389-95.
181. Flaherty, J., et al., *Pilot trial of selective decontamination for prevention of bacterial infection in an intensive care unit*. *J Infect Dis*, 1990. 162(6): p. 1393-7.
182. Silvestri, L., et al., *Prevention of MRSA pneumonia by oral vancomycin decontamination: a randomised trial*. *Eur Respir J*, 2004. 23(6): p. 921-6.
183. Stiefel, U., et al., *Effect of the increasing use of piperacillin/tazobactam on the incidence of vancomycin-resistant enterococci in four academic medical centers*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004. 25(5): p. 380-3.
184. Salgado, C.D., E.T. Giannetta, and B.M. Farr, *Failure to develop vancomycin-resistant Enterococcus with oral vancomycin treatment of Clostridium difficile*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004. 25(5): p. 413-7.
185. Stoutenbeek, C.P., H.K. van Saene, and D.F. Zandstra, *The effect of oral non-absorbable antibiotics on the emergence of resistant bacteria in patients in an intensive care unit*. *J Antimicrob Chemother*, 1987. 19(4): p. 513-20.
186. Lingnau, W., et al., *Changing bacterial ecology during a five-year period of selective intestinal decontamination*. *J Hosp Infect*, 1998. 39(3): p. 195-206.
187. Leone, M., et al., *Long-term (6-year) effect of selective digestive decontamination on antimicrobial resistance in intensive care, multiple-trauma patients*. *Crit Care Med*, 2003. 31(8): p. 2090-5.
188. de la Cal, M.A., et al., *Effectiveness and safety of enteral vancomycin to control endemicity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a medical/surgical intensive care unit*. *J Hosp Infect*, 2004. 56(3): p. 175-83.
189. Sarginson, R.E., et al., *Infection in prolonged pediatric critical illness: A prospective four-year study based on knowledge of the carrier state*. *Crit Care Med*, 2004. 32(3): p. 839-47.
190. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. *N Engl J Med*, 2001. 344(10): p. 699-709.
191. van den Berghe, G., et al., *Intensive insulin therapy in critically ill patients*. *N Engl J Med*, 2001. 345(19): p. 1359-67.
192. Atuma, C., et al., *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 280(5): p. G922-9.
193. Qin, X., et al., *Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function*. *Shock*, 2008. 29(3): p. 372-6.
194. Kistler, E.B., T.E. Hugli, and G.W. Schmid-Schonbein, *The pancreas as a source of cardiovascular cell activating factors*. *Microcirculation*, 2000. 7(3): p. 183-92.
195. Deitch, E.A., et al., *Bacterial translocation from the gut impairs systemic immunity*. *Surgery*, 1991. 109(3 Pt 1): p. 269-76.
196. Yao, Y.M., et al., *Role of gut-derived endotoxaemia and bacterial translocation in rats after thermal injury: effects of selective decontamination of the digestive tract*. *Burns*, 1995. 21(8): p. 580-5.
197. Yao, Y.M., et al., *Influence of selective decontamination of the digestive tract on cell-mediated immune function and bacteria/endotoxin translocation in thermally injured rats*. *J Trauma*, 1997. 42(6): p. 1073-9.

198. Horton, J.W., et al., *Selective decontamination of the digestive tract attenuated the myocardial inflammation and dysfunction that occur with burn injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 287(5): p. H2241-51.
199. Horton, J.W., et al., *Reducing susceptibility to bacteremia after experimental burn injury: a role for selective decontamination of the digestive tract*. J Appl Physiol (1985), 2007. 102(6): p. 2207-16.
200. Chen, L.W., et al., *Commensal microflora induce host defense and decrease bacterial translocation in burn mice through toll-like receptor 4*. J Biomed Sci, 2010. 17: p. 48.
201. Baker, J.W., et al., *Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut*. J Trauma, 1988. 28(7): p. 896-906.
202. Deitch, E.A., et al., *Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation is reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation*. Surgery, 1988. 104(2): p. 191-8.
203. Kahlke, V., et al., *Selective decontamination of the digestive tract: impact on cytokine release and mucosal damage after hemorrhagic shock*. Crit Care Med, 2002. 30(6): p. 1327-33.
204. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy*. Ann Surg, 1992. 216(2): p. 117-34.
205. Sharpe, S.M., et al., *Loss of the intestinal mucus layer in the normal rat causes gut injury but not toxic mesenteric lymph nor lung injury*. Shock, 2010. 34(5): p. 475-81.
206. Ben, D.F., et al., *TLR4 mediates lung injury and inflammation in intestinal ischemia-reperfusion*. J Surg Res, 2012. 174(2): p. 326-33.
207. Cooke, K.R., et al., *Hypo-responsiveness of donor cells to lipopolysaccharide stimulation reduces the severity of experimental idiopathic pneumonia syndrome: potential role for a gut-lung axis of inflammation*. J Immunol, 2000. 165(11): p. 6612-9.
208. van der Waaij, D., et al., *Clinical use of selective decontamination: the concept*. Intensive Care Med, 1990. 16 Suppl 3: p. S212-6.
209. van Uffelen, R., J.H. Rommes, and H.K. van Saene, *Preventing lower airway colonization and infection in mechanically ventilated patients*. Crit Care Med, 1987. 15(2): p. 99-102.
210. van Saene, H.K. and C.P. Stoutenbeek, *Selective decontamination*. J Antimicrob Chemother, 1987. 20(4): p. 462-5.
211. Hughes, B., B.R. Madan, and J.R. Parratt, *Polymyxin B sulphate protects cats against the haemodynamic and metabolic effects of E. coli endotoxin*. Br J Pharmacol, 1981. 74(3): p. 701-7.
212. From, A.H., J.S. Fong, and R.A. Good, *Polymyxin B sulfate modification of bacterial endotoxin: effects on the development of endotoxin shock in dogs*. Infect Immun, 1979. 23(3): p. 660-4.
213. Hazenberg, M.P., A.M. Pennock-Schroder, and J.P. van de Merwe, *Binding to and antibacterial effect of aztreonam, temocillin, gentamicin and tobramycin on human faeces*. J Hyg (Lond), 1985. 95(2): p. 255-63.
214. Van Saene, H.K. and C.P. Stoutenbeek, *Oropharyngeal and gastrointestinal carriage in the critically ill*. Agressologie, 1990. 31(8 Spec No): p. 557-9.
215. van Saene, J.J., H.K. van Saene, and C.F. Lerk, *Inactivation of quinolone by feces*. J Infect Dis, 1986. 153(5): p. 999-1000.

216. Stoutenbeek, C.P., et al., *The effect of selective decontamination of the digestive tract on colonisation and infection rate in multiple trauma patients.* Intensive Care Med, 1984. 10(4): p. 185-92.
217. Jones, W.G., 2nd, et al., *Antibiotic prophylaxis diminishes bacterial translocation but not mortality in experimental burn wound sepsis.* J Trauma, 1990. 30(6): p. 737-40.
218. Goris, R.J., et al., *Does selective decontamination of the gastrointestinal tract prevent multiple organ failure? An experimental study.* Arch Surg, 1991. 126(5): p. 561-5.
219. Rosman, C., et al., *Selective decontamination of the digestive tract prevents secondary infection of the abdominal cavity, and endotoxemia and mortality in sterile peritonitis in laboratory rats.* Crit Care Med, 1992. 20(12): p. 1699-704.
220. van Saene, H.K. and A. Percival, *Bowel microorganisms--a target for selective antimicrobial control.* J Hosp Infect, 1991. 19 Suppl C: p. 19-41.
221. Horton, J.W., et al., *Burn injury decreases myocardial Na-K-ATPase activity: role of PKC inhibition.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. 293(4): p. R1684-92.
222. Imai, Y., et al., *Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome.* JAMA, 2003. 289(16): p. 2104-12.
223. Nin, N., et al., *Rats surviving injurious mechanical ventilation show reversible pulmonary, vascular and inflammatory changes.* Intensive Care Med, 2008. 34(5): p. 948-56.
224. Nin, N., et al., *Large tidal volume mechanical ventilation induces vascular dysfunction in rats.* J Trauma, 2005. 59(3): p. 711-6.
225. Miyahara, T., et al., *Phosphoinositide 3-kinase, Src, and Akt modulate acute ventilation-induced vascular permeability increases in mouse lungs.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 293(1): p. L11-21.
226. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. 150(1): p. 76-85.
227. Wiechelman, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick, *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation.* Anal Biochem, 1988. 175(1): p. 231-7.
228. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
229. Nin, N., et al., *Ventilation-induced lung injury in rats is associated with organ injury and systemic inflammation that is attenuated by dexamethasone.* Crit Care Med, 2006. 34(4): p. 1093-8.
230. Nin, N., et al., *High-tidal volume ventilation aggravates sepsis-induced multiorgan dysfunction in a dexamethasone-inhibitable manner.* Shock, 2009. 31(4): p. 429-34.
231. Nin, N., et al., *Aging increases the susceptibility to injurious mechanical ventilation.* Intensive Care Med, 2008. 34(5): p. 923-31.
232. Izquierdo-Garcia, J.L., et al., *A metabolomic approach for diagnosis of experimental sepsis.* Intensive Care Med, 2011.

233. Marin-Corral, J., et al., *Redox balance and cellular inflammation in the diaphragm, limb muscles, and lungs of mechanically ventilated rats*. *Anesthesiology*, 2010. 112(2): p. 384-94.
234. Dreyfuss, D. and G. Saumon, *Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(1): p. 294-323.
235. Frank, J.A., et al., *Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 165(2): p. 242-9.
236. de Perrot, M., et al., *Effect of ventilator-induced lung injury on the development of reperfusion injury in a rat lung transplant model*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002. 124(6): p. 1137-44.
237. Slutsky, A.S. and V.M. Ranieri, *Mechanical ventilation: lessons from the ARDSNet trial*. *Respir Res*, 2000. 1(2): p. 73-7.
238. Matute-Bello, G., et al., *An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 44(5): p. 725-38.
239. Wilson, M.R., B.V. Patel, and M. Takata, *Ventilation with "clinically relevant" high tidal volumes does not promote stretch-induced injury in the lungs of healthy mice*. *Crit Care Med*, 2012. 40(10): p. 2850-7.
240. Hegeman, M.A., et al., *The extent of ventilator-induced lung injury in mice partly depends on duration of mechanical ventilation*. *Crit Care Res Pract*, 2013. 2013: p. 435236.
241. Niitsu, T., et al., *Cyclooxygenase inhibition in ventilator-induced lung injury*. *Anesth Analg*, 2011. 112(1): p. 143-9.
242. Broccard, A.F., et al., *Consequences of vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(6 Pt 1): p. 1935-42.
243. Hernandez, L.A., et al., *Mechanical ventilation increases microvascular permeability in oleic acid-injured lungs*. *J Appl Physiol (1985)*, 1990. 69(6): p. 2057-61.
244. Izquierdo-Garcia, J.L., et al., *A Metabolomic Approach to the Pathogenesis of Ventilator-induced Lung Injury*. *Anesthesiology*, 2014. 120(3): p. 694-702.
245. Wolthuis, E.K., et al., *Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice*. *Crit Care*, 2009. 13(1): p. R1.
246. Choi, W.I., et al., *Systemic microvascular leak in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. 167(12): p. 1627-32.
247. Whitehead, T.C., et al., *Effect of mechanical ventilation on cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide*. *Anesthesiology*, 2004. 101(1): p. 52-8.
248. Bezzant, T.B. and J.D. Mortensen, *Risks and hazards of mechanical ventilation: a collective review of published literature*. *Dis Mon*, 1994. 40(11): p. 581-638.
249. Gammanpila, S., D.R. Bevan, and R. Bhudu, *Effect of positive and negative expiratory pressure on renal function*. *Br J Anaesth*, 1977. 49(3): p. 199-205.
250. Love, R., et al., *Positive end-expiratory pressure decreases mesenteric blood flow despite normalization of cardiac output*. *J Trauma*, 1995. 39(2): p. 195-9.

251. Borelli, M., et al., *Severe acute respiratory failure managed with continuous positive airway pressure and partial extracorporeal carbon dioxide removal by an artificial membrane lung. A controlled, randomized animal study.* Am Rev Respir Dis, 1988. 138(6): p. 1480-7.
252. Montgomery, A.B., et al., *Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome.* Am Rev Respir Dis, 1985. 132(3): p. 485-9.
253. Mandava, S., et al., *Lethal systemic capillary leak syndrome associated with severe ventilator-induced lung injury: an experimental study.* Crit Care Med, 2003. 31(3): p. 885-92.
254. Chiumello, D., G. Pristine, and A.S. Slutsky, *Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. 160(1): p. 109-16.
255. Held, H.D., et al., *Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(3 Pt 1): p. 711-6.
256. Lin, C.Y., et al., *Mechanical ventilation may increase susceptibility to the development of bacteremia.* Crit Care Med, 2003. 31(5): p. 1429-34.
257. Serkova, N.J., et al., *Utility of magnetic resonance imaging and nuclear magnetic resonance-based metabolomics for quantification of inflammatory lung injury.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 295(1): p. L152-61.
258. DeMeester, S.R., et al., *The bimodal expression of tumor necrosis factor-alpha in association with rat lung reimplantation and allograft rejection.* J Immunol, 1993. 150(6): p. 2494-505.
259. Frank, J.A., et al., *Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade.* Thorax, 2008. 63(2): p. 147-53.
260. Narimanbekov, I.O. and H.J. Rozycki, *Effect of IL-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-induced lung injury in a rabbit model.* Exp Lung Res, 1995. 21(2): p. 239-54.
261. Haitsma, J.J., et al., *Injurious ventilation strategies cause systemic release of IL-6 and MIP-2 in rats in vivo.* Clin Physiol Funct Imaging, 2003. 23(6): p. 349-53.
262. dos Santos, C.C. and A.S. Slutsky, *Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome.* Intensive Care Med, 2000. 26(5): p. 638-42.
263. Vlahakis, N.E. and R.D. Hubmayr, *Invited review: plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells.* J Appl Physiol (1985), 2000. 89(6): p. 2490-6;discussion 2497.
264. Belperio, J.A., et al., *Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome.* J Immunol, 2002. 169(2): p. 1037-49.
265. Quinn, D.A., et al., *Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury.* J Appl Physiol (1985), 2002. 93(2): p. 517-25.
266. Belperio, J.A., et al., *Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury.* J Clin Invest, 2002. 110(11): p. 1703-16.

267. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(5): p. 353-64.
268. Vaneker, M., et al., *Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice*. *Anesthesiology*, 2008. 109(3): p. 465-72.
269. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. 124(4): p. 783-801.
270. Vaneker, M., et al., *Mechanical ventilation induces a Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon beta-dependent inflammatory response in healthy mice*. *Anesthesiology*, 2009. 111(4): p. 836-43.
271. Sato, M., et al., *Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction*. *Immunity*, 2000. 13(4): p. 539-48.
272. Wolthuis, E.K., et al., *Mechanical ventilation with lower tidal volumes and positive end-expiratory pressure prevents pulmonary inflammation in patients without preexisting lung injury*. *Anesthesiology*, 2008. 108(1): p. 46-54.
273. Plotz, F.B., et al., *Mechanical ventilation alters the immune response in children without lung pathology*. *Intensive Care Med*, 2002. 28(4): p. 486-92.
274. Kresch, M.J., et al., *Ontogeny of apoptosis during lung development*. *Pediatr Res*, 1998. 43(3): p. 426-31.
275. Sherrill, D.L., A. Camilli, and M.D. Lebowitz, *On the temporal relationships between lung function and somatic growth*. *Am Rev Respir Dis*, 1989. 140(3): p. 638-44.
276. May, M., et al., *Apoptosis and proliferation in lungs of human fetuses exposed to chorioamnionitis*. *Histopathology*, 2004. 45(3): p. 283-90.
277. Mokres, L.M., et al., *Prolonged mechanical ventilation with air induces apoptosis and causes failure of alveolar septation and angiogenesis in lungs of newborn mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. 298(1): p. L23-35.
278. Makena, P.S., et al., *Deletion of apoptosis signal-regulating kinase-1 prevents ventilator-induced lung injury in mice*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. 46(4): p. 461-9.
279. Edwards, Y.S., et al., *Cyclic stretch induces both apoptosis and secretion in rat alveolar type II cells*. *FEBS Lett*, 1999. 448(1): p. 127-30.
280. Hammerschmidt, S., et al., *[Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type-II-cells--influence of captopril and L-Arginine]*. *Pneumologie*, 2004. 58(4): p. 222-9.
281. Sanchez-Esteban, J., et al., *Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 282(3): p. L448-56.
282. Gao, J., et al., *Preconditioning effects of physiological cyclic stretch on pathologically mechanical stretch-induced alveolar epithelial cell apoptosis and barrier dysfunction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 448(3): p. 342-8.
283. Hammerschmidt, S., et al., *Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type II cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. 30(3): p. 396-402.

284. Hargitai, B., et al., *Apoptosis in various organs of preterm infants: histopathologic study of lung, kidney, liver, and brain of ventilated infants*. *Pediatr Res*, 2001. 50(1): p. 110-4.
285. Cappello, F., et al., *Defective apoptosis and tumorigenesis: role of p53 mutation and Fas/FasL system dysregulation*. *Eur J Histochem*, 2002. 46(3): p. 199-208.
286. Sotoudeh, M., et al., *Induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells by mechanical stretch*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 282(5): p. H1709-16.
287. Ngiam, N., M. Post, and B.P. Kavanagh, *Early growth response factor-1 in acute lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 293(5): p. L1089-91.
288. Perl, M., et al., *Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 176(6): p. 591-601.
289. Kavurma, M.M. and L.M. Khachigian, *Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression*. *Cell Death Differ*, 2003. 10(1): p. 36-44.
290. Ma, J., et al., *Targeted knockdown of EGR-1 inhibits IL-8 production and IL-8-mediated invasion of prostate cancer cells through suppressing EGR-1/NF-kappaB synergy*. *J Biol Chem*, 2009. 284(50): p. 34600-6.
291. Gangadharan, C., M. Thoh, and S.K. Manna, *Late phase activation of nuclear transcription factor kappaB by doxorubicin is mediated by interleukin-8 and induction of apoptosis via FasL*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. 120(3): p. 671-83.
292. Ohtsuka, Y., et al., *MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine*. *Gut*, 2001. 49(4): p. 526-33.
293. Horton, J.W., et al., *Myocardial inflammatory responses to sepsis complicated by previous burn injury*. *Surg Infect (Larchmt)*, 2003. 4(4): p. 363-77.
294. Bahrami, B., S. Macfarlane, and G.T. Macfarlane, *Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines*. *J Appl Microbiol*, 2011. 110(1): p. 353-63.
295. Chen, L.W., P.H. Chen, and C.M. Hsu, *Commensal microflora contribute to host defense against Escherichia coli pneumonia through Toll-like receptors*. *Shock*, 2011. 36(1): p. 67-75.
296. Nayci, A., et al., *Gut decontamination prevents bronchoscopy-induced bacterial translocation. An experimental study in rats*. *Respiration*, 2004. 71(1): p. 66-71.
297. Akram, A., et al., *Activating transcription factor 3 confers protection against ventilator-induced lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182(4): p. 489-500.
298. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. *J Immunol*, 2005. 175(6): p. 3463-8.

